

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES
Y AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA



TESIS DOCTORAL

Disciplina: Biología

**Caracterización del transcriptoma y proteoma intestinal de
Ornithodoros moubata.**

Utilidad para la búsqueda de antígenos vacunales.

Defendida por:

Prosper OBOLO MVOULOUGA

2017

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC).

Para su estancia en España, Don Prosper OBOLO MVOULOUGA ha disfrutado de una beca de categoría E del Estado de Gabón.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto AGL2013-42745-P.



LOS DOCTORES D. RICARDO PÉREZ SÁNCHEZ Y DÑA. ANA OLEAGA PÉREZ, INVESTIGADORES CIENTÍFICOS DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA (IRNASA-CSIC),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización del transcriptoma y proteoma intestinal de *Ornithodoros moubata*. Utilidad para la búsqueda de antígenos vacunales.**”, presentada por Don Prosper OBOLO MVOULOUGA, Licenciado en Biología y Máster Oficial en Enfermedades Tropicales, ha sido desarrollada en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) bajo nuestra dirección y tutela, y cumple las condiciones para optar al grado de *Doctor* por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman y sellan el correspondiente certificado en Salamanca a 9 de marzo de 2017.

Fdo: Dr. Ricardo PÉREZ SÁNCHEZ

Fdo: Dra. Ana OLEAGA PÉREZ

ESTHER DEL OLMO FERNÁNDEZ PROFESORA TITULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y DIRECTORA DEL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN SALUD Y DESARROLLO EN LOS TRÓPICOS ,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización del transcriptoma y proteoma intestinal de *Ornithodoros moubata*. Utilidad para la búsqueda de antígenos vacunales.**” realizada por D. Prosper OBOLO MVOULOUGA, bajo la dirección y tutela de los doctores D. Ricardo PÉREZ SÁNCHEZ y Dña. Ana OLEAGA PÉREZ, Investigadores Científicos del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC) se ejecutó en el marco del citado Programa Doctoral.

Para que conste y a los efectos oportunos, firma y sella el presente certificado en Salamanca a 9 de marzo de 2017.

Fdo: Prof. Dra. Esther del Olmo

AGRADECIMIENTOS

El doctorado no es un fin en si, pero la academia no nos dará más título que este. Así que se acaba esta casa en cuya obra participaron varios, y las casas se acaban con los techadores. Doy las gracias a los techadores: mis directores de Tesis; los doctores Ana OLEAGA PÉREZ y Ricardo PÉREZ SÁNCHEZ. Primero por haberme aceptado en su grupo de investigación y, luego, acogido en su proyecto tras el escabullimiento de *Loa loa*. Segundo por haberme llevado con esmero a través de la variada topografía del ritual del impetrante doctor.

“*Pugha barih kayié o'burüh*” (al pueblo ajeno se va para/por alguien) dicen los Teghe; plasmo aquí mi agradecimiento a la Dra. Esther del Olmo por la gran ayuda prestada.

Al Dr. Raúl MANZANO ROMÁN, no solo por su asistencia en biología molecular, sino, por inherencia cultural mía, haberle visto como a un *hermano mayor* en lo que me explicaba.

Al personal del IRNASA Rocío VIZCAÍNO, Diana RAMOS, María GARCÍA, Carmen PASTOR y Ana BAÍLLO. A cada una, no por su trabajo, sino por la disposición con la que me atendieron.

En la estructura de la casa ayudó mucha gente:

Al Dr. Ignacio GÜEZMEZ VILLAFANEZ. Un buen hecho nunca se pierde, aprendí a primeras horas.

A Ana María NÚÑEZ SÁNCHEZ, y los suyos, por su mano tendida durante los años de licenciatura.

“*Yülü lah ndjigha mpar'adza*”(se aprende mejor a trepar sobre arboles encima de un río). Gracias a mi amigo-hermano AKAL'YUB MOUBAMBA por haberse ofrecido *limpiamente* a servir de *base arrière* española. Y a Ana GONZÁLEZ RUIZ de ser para él la que refiere la “*Grande-Royale*”.

Desde las fundaciones: “*Ombila nkuönô atch'i*” (en familia el oír es convocatoria).

De SOSUHO a España, pasando por Yia y el Estuaire el camino no ha faltado de asperezas. No hubiera llegado sin el apoyo multiforme de vosotros mis hermanos y hermanas de todas mis *madres* (fratría de la madre, y mujeres que como hijo te acogen), quienes con vuestro corazón y mano habéis sostenido mi andadura.

Era principio de curso, iba a segundo de la ESO, madre me dijiste, con una sonrisa litótica: “ve a la escuela, yo te compraré los cuadernos”. Viniendo de donde venimos, aquella voz se ha ido actualizando en mi cabeza guardando su doble naturaleza de esperanza-obligación. Gracias *Otsûrigui* (madre biológica), gracias *madres*, de las que estás tú, ENONI.

Un padre sabe que no siempre estará allí, e implanta en el hijo una ley-principio que le indique siempre el horizonte. *Däh* (padre), mi admirativo agradecimiento por esa tarde, tendría yo diecisiete años, cuando me enseñaste interrogativamente sobre la herencia de un padre. Aun no hemos contestado del todo. Gracias *Ba Däh* (fratria del padre).

Lavê lah bêh (Gracias a todos).

REMERCIEMENTS

Le doctorat n'est pas une fin en soit, mais l'académie ne nous donnera pas plus de titre que celui-ci. Ainsi s'achève cet édifice dont l'ouvrage a vu la participation de plusieurs. Et comme les maisons s'achèvent aux mains des tâliers, je remercie alors les tâliers: mes directeurs de Thèse; les docteurs Ana OLEAGA PÉREZ et Ricardo PÉREZ SÁNCHEZ. Premièrement pour m'avoir accepté au sein de leur groupe de recherche puis, par la suite, admis à leur projet après les mésaventures de *Loa loa*, et en fin pour m'avoir conduit avec attention au travers de la topographie variée du rituel de l'impétrant docteur.

« *Pugha barih kayié o'burüh* » (à un village étranger on y va grâce/pour quelqu'un) disent les Teghe; je traduit ici mes remerciements à la Dr. Esther del OLMO FERNANDEZ pour toute l'aide apportée.

Au Dr. Raúl MANZANO ROMÁN, non seulement pour son assistance en biologie moléculaire, mais surtout, cela du fait de mon inhérence culturel, d'avoir permit que je le voie comme un *grand-frère* de par ses explications.

Au personnel de l'IRNASA Rocío VIZCAÍNO, Diana RAMOS, María GARCÍA, Carmen PASTOR y Ana BAÍLLO. A chacune, non pas pour avoir fait leur travail, mais pour la considération témoignée.

À la structure de la maison plusieurs y ont aidé:

Au Dr. Ignacio GÜEZMEZ VILLAFANEZ. Un bien fait n'est jamais perdu, ai-je appris aux premières heures.

À Ana María NÚNEZ SÁNCHEZ, et aux siens, pour leur générosité pendant les années Maîtrise.

« *Yülü lah ndjigha mpar'adza* » (on apprend mieux à grimper sur les arbres au-dessus d'une rivière). Merci à mon frère-ami AKAL'YUB MOUBAMBA pour s'être offert, *comme un humain*, de base arrière espagnole le long de ces années. Á Ana GONZÁLEZ RUIZ, d'être pour lui celle dont réfère la Grande-Royale.

Depuis les fondements : “*Ombila nkuönô atch'ï*” (en famille l'ouïe est convocation).

De la SOSUHO en Espagne, en enjambant Yia et l'Estuaire, le chemin a été meublé d'aspérités. Je n'y serais certainement pas arrivé sans l'appui multiforme de mes frères et sœurs, de toutes mes *mères* (fratrie de la mère, et femmes qui te prennent comme fils), qui avec votre coeur et main avez soutenu ma marche.

C'était la rentrée des classes, j'allais en 5ème, mère, avec un sourire litotique, tu m'as dit: "vas à l'école, je t'achèterai les cahiers". Venant d'où nous venons, cette voix, au fil des ans, s'est actualisée en moi, tout en conservant sa double nature d'espoir-obligation. Merci *Otsûrigui* (mère biologique), merci *mères*, dont toi ENONI.

Un père sait qu'un jour il ne sera plus là, alors il plante en son fils une loi-principe qui lui indiquera toujours l'horizon. *Däh* (père), ma reconnaissance admirative pour cet après-midi, j'avais probablement dix-sept ans, quand tu m'enseignas, par le questionnement, sur l'héritage d'un père. Nous n'avons pas encore entièrement répondu. Merci *Ba Däh* (fratrie du père).

Lavê lah bêh (Merci à tous).

“Puedes saber toda la ciencia, si no sabes quien eres no sabes nada (Cheikh Anta DIOP) ”:

A Atenwa, a los que estuvieron y están, y que estarán.

“Tu peux savoir toute la science, si tu ne sais pas qui tu es alors tu ne sais rien (Cheikh Anta DIOP) ”:

À Atenwa, à ceux qui furent et y sont, et qui seront.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario.

ANOVA: Análisis de la varianza de una vía.

anti-His Tag: IgG dirigida contra cola de histidina

BSA: Albúmina de suero bovino.

d.p.i.: Días post-inmunización.

DEG: *Differentially Expressed Genes*.

DO: Densidad óptica.

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

nanoESI-Q-TOF: *nano electrospray ionization quadrupole time-of-flight*.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

emPAI: Índice de abundancia proteica modificado exponencialmente.

FCA: Adyuvante completo de Freund.

FDR: *false discovery rate* .

FIA: Adyuvante incompleto de Freund.

GO: *Gene Ontology*.

GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol.

GST: Glutación S-transferasa.

h.p.a.: Horas post-alimentación.

HSP: Proteína de choque térmico.

IPTG: Isopropil β - D- 1- thiogalactopiranosido.

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.*

KLH: Hemocianina de la lapa gigante de California.

LB: Medio Luria-Bertani.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a sistema de espectrometría de masa en tándem.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

M-0: Extracto de proteínas intestinales insolubles en ayunas.

M-1: Extracto de proteínas intestinales insolubles post alimentación.

NGS: *Next-generation sequencing*

PANTHER: *Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships.*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pfam: *Protein Families Database.*

pI: Punto isoeléctrico.

PIT: Proteoma informado por el transcriptoma.

PM: Peso molecular .

PPA: Peste Porcina Africana.

RT-PCR: *Reverse Transcription PCR.*

qRT-PCR: *PCR cuantitativa a tiempo real*

RIN: *RNA integrity number.*

RNA-seq: *RNA sequencing.*

RNA^m poliA⁺: ARN mensajero poliadenilado.

RNAⁱ: ARN interferente.

RPKM: Número de lecturas por kilobase de transcrito por cada millón de lecturas mapeadas.

RSEM: *RNA-Seq by Expectation Maximization.*

S-0: Extracto de proteínas intestinales solubles en ayunas.

S-1: Extracto de proteínas intestinales solubles post alimentación.

SGE: Extracto soluble de las glándulas salivales

SOD: Superóxido dismutasa.

PBS: Tampón fosfato salino.

TBE: Tris-Borato-EDTA.

TBRF: *Tick-Borne Relapsing Fever.*

TFA: Ácido trifluoroacético.

TM: Dominios transmembrana.

TPBS: PBS con Tween-20 al 0,05%.

TRIS: Trishidroximetilaminometano.

TSAP: *Fosfatasa alcalina termosensible..*

INTRODUCCIÓN

1. Características biológicas de las garrapatas.....	3
2.Importancia sanitaria de las garrapatas blandas del género <i>Ornithodoros</i>	3
3. Vigilancia epidemiológica: métodos de localización de poblaciones del género <i>Ornithodoros</i>	5
4. Métodos de control de <i>Ornithodoros</i>	7
5. Definición del antígeno ideal para el desarrollo de vacunas anti-garrapata.....	9
6. Desarrollo de vacunas frente a argásidos.....	11
6.1. Ensayos con antígenos salivales.....	13
6.2. Ensayos con antígenos ocultos.....	16
7.Nuevas estrategias para la identificación de antígenos protectores.....	18
7.1. Introducción a la vacunología reversa.....	18
7.2. Vacunología reversa aplicada al desarrollo de vacunas frente a argásidos.....	20

HYPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
----------------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
-------------------------	----

I. MATERIAL PARASITARIO Y MÉTODOS GENERALES.....	31
II. PARÁSITOS.....	31
III. MATERIAL PARASITARIO	31
<i>Intestino medio</i>	31

Saliva.....	32
IV. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS E INMUNOENZIMÁTICAS.....	32
<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	32
<i>Tinción de los geles</i>	33
<i>Western blot</i>	33

OBJETIVO 1.

OBTENCIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DEL INTESTINO DE HEMBRAS DE *O. MOUBATA* EN AYUNAS Y A LAS 48 HORAS

POST-ALIMENTACIÓN.....35

- 1.1. RNA-Seq: purificación del ARNm poli A+ y secuenciación en plataforma ILLUMINA.....35
- 1.2. Procesamiento bioinformático y ensamblaje de los genes.....35
- 1.3. Caracterización del transcriptoma: identificación de genes y anotación de funciones.....36
- 1.4. Análisis de la expresión diferencial de genes entre garrapatas en ayunas y a las 48 horas post-alimentación.....37
- 1.5. Validación experimental de los resultados del rna-seq: cuantificación de los transcritos.....37

OBJETIVO 2.

OBTENCIÓN DEL PROTEOMA DEL INTESTINO DE HEMBRAS DE *O. MOUBATA* EN AYUNAS Y A LAS 48 HORAS POST-ALIMENTACIÓN.....39

- 2.1. Preparación de extractos proteicos del intestino medio de hembras en ayunas y de hembras alimentadas tomadas a las 48 h.p.a.39
- 2.2. Fraccionamiento en gel monodimensional.....39
- 2.3. Digestión con tripsina y LC-MS/MS.....40
- 2.4. Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas.....40
- 2.5. Anotación funcional y clasificación de las proteínas.....41

OBJETIVO 3.

SELECCIÓN IN SILICO DE ANTÍGENOS INTESTINALES POTENCIALMENTE PROTECTORES BASADA EN CRITERIOS DE INMUNOGENICIDAD, LOCALIZACIÓN CELULAR Y SOBREEXPRESIÓN TRAS LA ALIMENTACIÓN.....43

- 3.1. Selección de genes/proteínas sobre-expresados a las 48 h.p.a.43
- 3.2. Selección de proteínas antigénicas.43
- 3.3. Selección de proteínas de membrana..... 43
- 3.4. Inspección/selección manual..... 44
- 3.5. Topología de los candidatos antigénicos y selección de los fragmentos/dominios óptimos para su producción en forma recombinante o por síntesis química..... 45

OBJETIVO 4.

PRODUCCIÓN DE FORMAS RECOMBINANTES TRUNCADAS Y/O DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS A PARTIR DE LOS CANDIDATOS ANTIGÉNICOS SELECCIONADOS.....47

- 4.1. Verificación experimental de las secuencias obtenidas por RNA-Seq para los candidatos seleccionados.....47
 - 4.1.1. Amplificación de los ADNc completos.....47
 - 4.1.2. Purificación de los productos de PCR.....50
 - 4.1.3. Clonaje y secuenciación.....50
- 4.2. Producción en forma recombinante de las partes extracelulares de los candidatos seleccionados.....52
 - 4.2.1. Amplificación de las regiones extracelulares.....52
 - 4.2.2. Clonaje en el vector pQE-30.....54
 - 4.2.3. Transformación de células competentes *E. coli* M15 con los plásmidos recombinantes pQE-30-inserto.....56

4.2.4. Expresión de las proteínas recombinantes truncadas rtOm86, rtOm29, rtOm28 y rtOm17.....	57
4.2.5. Purificación de las proteínas recombinantes rtOm86 y rtOm17.....	57
4.3. Predicción de epítomos b, diseño y síntesis química de péptidos inmunogénicos a partir de los dominios extracelulares de los candidatos.....	59
OBJETIVO 5.	
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE LOS CANDIDATOS EN PRUEBAS DE VACUNACIÓN DE ANIMALES.....	61
5.1. Primer ensayo: vacunación con las proteínas recombinantes.....	61
5.1.1. Inmunización.....	61
5.1.2. Infestaciones.....	62
5.1.3. Parámetros analizados para determinar la acción de la respuesta inmunitaria.....	62
5.1.4. Análisis estadístico.....	63
5.2. Segundo ensayo: vacunación con los conjugados KLH-péptido sintético.....	63
5.2.1. Inmunización.....	63
5.2.2. Infestaciones, acción de la respuesta inmunitaria y análisis estadístico.....	64

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJETIVO 1.

TRANSCRIPTOMA DEL INTESTINO MEDIO DE HEMBRAS DE *O.*

MOUBATA.....67

- 1.1. Secuenciación y ensamblaje de novo del transcriptoma del intestino medio de hembras de *O. moubata* en ayunas y a las 48 horas post-alimentación.....67
- 1.2. Anotación funcional y clasificación de los transcritos.....67
 - 1.2.1. *Clasificación por función molecular y proceso biológico*.....68
 - 1.2.2. *Identificación de rutas biológicas activas*.....68
- 1.3. Genes diferencialmente expresados en el intestino medio a las 48 h.p.a.....72
 - 1.3.1. *Número y distribución de los genes diferencialmente expresados*.....72
 - 1.3.2. *Significado biológico de los genes diferencialmente expresados*.....73
 - 1.3.3. *Genes involucrados en la alimentación, en la digestión de la sangre y en la defensa*.....80
- 1.4. Validación experimental de los resultados del RNA-Seq: cuantificación de los transcritos.....96

OBJETIVO 2.

PROTEOMA DEL INTESTINO MEDIO DE HEMBRAS DE *O.*

***MOUBATA*.....99**

- 2.1. Extractos proteicos del intestino medio de hembras en ayunas y de hembras alimentadas tomadas a las 48 h.p.a.....**99**
- 2.2. Proteínas identificadas.....**100**
- 2.3. Caracterización y análisis comparativo del proteoma intestinal antes y después de la alimentación.....**105**
- 2.4. Proteínas implicadas en la toma de sangre y el proceso de digestión.....**110**
 - 2.4.1. *Metabolismo y transporte de proteínas, carbohidratos y lípidos*.....**110**

OBJETIVO 3.

**PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS POTENCIALMENTE PROTECTORAS
SELECCIONADAS IN SILICO COMO CANDIDATOS**

VACUNALES.....131

- 3.1. Selección de proteínas asociadas a membranas, sobre-expresadas y antigénicas.....**131**
- 3.2. Candidatos vacunales elegidos tras la inspección/selección manual.....**132**

OBJETIVO 4.

PRODUCCIÓN DE FRAGMENTOS RECOMBINANTES Y DE PÉPTIDOS

SINTÉTICOS A PARTIR DE LOS CANDIDATOS ANTIGÉNICOS

SELECCIONADOS.....135

4.1. Verificación de las secuencias obtenidas por RNA-Seq para los candidatos seleccionados.....	135
4.2. Topología de las proteínas seleccionadas como candidatos antigénicos.....	139
4.3. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes rOm86, rOm29, rOm28 y rOm17.....	142
4.3.1. Solubilización y purificación de rOm17.....	143
4.3.2. Solubilización y purificación de rOm86.....	144
4.4. Diseño y producción de péptidos sintéticos a partir de Om99, Om85 y Om03.....	145

OBJETIVO 5.

EFICACIA VACUNAL DE LOS

CANDIDATOS.....149

5.1. Vacunación con las proteínas recombinantes rOm86 y rOm17. valor protector frente a <i>O. moubata</i> y <i>O. erraticus</i>	149
5.1.1. Título y especificidad de los sueros inmunes.....	149
5.1.2. Acción de la respuesta inmunitaria sobre <i>O. moubata</i>	155
5.1.3. Acción de la respuesta inmunitaria sobre <i>O. erraticus</i>	156
5.2. Vacunación con los péptidos sintéticos OM99, OM85 y OM03 conjugados con KLH. valor protector frente a <i>O. moubata</i> y <i>O. erraticus</i>	161
5.2.1. Título y especificidad de los sueros inmunes.....	161
5.2.2. Acción de la respuesta inmunitaria sobre <i>O. moubata</i>	167

5.2.3. <i>Acción de la respuesta inmunitaria sobre O. erraticus</i>	167
5.3. Eficacia vacunal de los candidatos evaluados: resumen.....	171
CONCLUSIÓN	173
BIBLIOGRAFÍA	177

Cuadro 1. 1. Vacunología reversa aplicada el desarrollo de vacunas para el control de las infestaciones por garrapatas y de la transmisión de patógenos. La figura presenta un enfoque holístico (biología de sistemas) basado en la integración y análisis de datos ómicos obtenidos a partir del examen de las interacciones hospedador-garrapata-patógeno (de la Fuente et al., 2016).	20
Cuadro 1. 2. Principales procesos fisiológicos resultantes de la adaptación a la hematofagia de las garrapatas. Para cada uno de ellos se indican algunas de las moléculas implicadas que han sido ensayadas como candidatos vacunales. Los candidatos más prometedores están subrayados (de la Fuente et al., 2016).....	21
Cuadro 2. 1. Mapa del vector pSC-A, utilizado para el clonaje directo y secuenciación de los productos de PCR (Agilent Technologies).....	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 2. 2. Mapa de los vectores de expresión de la serie pQE-30 (Qiagen).	¡Error! Marcador no definido.

Tabla 1. 1. Pruebas de vacuna frente a argásidos utilizando antígenos ocultos y salivales. ... 11

Tabla 2. 1. Oligonucleótidos, mezcla de reacción y condiciones térmicas empleados en el análisis por qRT-PCR para la cuantificación de los niveles de ARNm de los genes seleccionados. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 2. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las secuencias codificantes completas de los candidatos antigénicos. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 3. Oligonucleótidos y condiciones térmicas empleados en la amplificación por PCR de las secuencias codificantes completas de los candidatos antigénicos. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 4. Mezcla de reacción para la digestión con EcoRI. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 5. Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de los insertos clonados en el vector pSC-A. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 6. Oligonucleótidos y condiciones térmicas empleados en la amplificación por PCR de las regiones extracelulares de los candidatos seleccionados. Los nucleótidos subrayados son el sitio de corte para las enzimas de restricción. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 7. Mezclas de reacción y condiciones térmicas utilizadas para la digestión de los amplicones tOm86 y tOm29 con la enzima BamHI y para la digestión de los amplicones tOm28 y tOm17 con BamHI + HindIII. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 8. Mezclas de reacción y condiciones térmicas utilizadas para: (i) la digestión/defosforilación simultánea con BamHI y TSAP; y (ii) la digestión simultánea con BamHI y HindIII, sin defosforilación, del vector pQE-30. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 9. Mezclas de reacción para las ligaciones de los insertos y el vector pQE-30. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 10. Protocolo de vacunación de conejos con las proteínas recombinantes. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2. 11. Protocolo de vacunación de conejos con las proteínas recombinantes. **¡Error! Marcador no definido.**

Índice de Tablas

Tabla 3. 1. Las 30 rutas biológicas más abundantemente representadas en el transcriptoma del intestino medio de <i>O. moubata</i>	¡Error! Marcador no definido.
--	--------------------------------------

Tabla 3. 2. Dominios proteicos (Pfam) más numerosos en los DEG en el intestino medio de las hembras alimentadas. Se muestran por separado los 30 dominios más numerosos en genes sobre-expresados y los 30 más numerosos en genes sub-expresados. Los dominios identificados tanto en genes sobre-expresados como en genes sub-expresados (14 en total) se señalan con un asterisco*. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 3. Selección de genes implicados en la digestión de proteínas, transporte y metabolismo de carbohidratos y transporte y metabolismo lipídico. Se indica el número de los genes sobre- y sub-expresados y el de los que no variaron significativamente (NS) tras la alimentación. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 4. Selección de genes implicados en la respuesta defensiva y en la respuesta al estrés oxidativo. Se indica el número de los genes sobre- y sub-expresados y de los que no variaron significativamente (NS) tras la alimentación. ... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 5. Número de proteínas únicas identificadas en las fracciones el intestino medio de hembras de *Ornithodoros moubata* sin alimentar y a las 48 horas de la toma de sangre (48 h.p.a.). Se han excluido las identificaciones redundantes y las proteínas contaminantes. Las fracciones solubles e insolubles son los sobrenadantes y sedimentos obtenidos tras centrifugar los homogenados intestinales a 100.0000 g. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 6. Clases de rutas enzimáticas y número de proteínas en cada clase identificadas en el intestino de las hembras de *O. moubata* en ayunas y alimentadas. Para una descripción más detallada consultar la tabla suplementaria 6. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 7. Proteínas identificadas en el intestino de hembras de *Ornithodoros moubata* en ayunas y a las 48 horas de la toma de sangre (Alim) implicadas en procesos proteolíticos. (T) proteína también identificada en el transcriptoma del intestino de *O. moubata*. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 8. Proteínas identificadas en el intestino de hembras de *Ornithodoros moubata*, en ayunas y a las 48 horas de la toma de sangre (Alim), implicadas en el metabolismo y transporte de carbohidratos. (T) proteína también identificada en el transcriptoma del intestino de *O. moubata*. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 9. Proteínas identificadas en el intestino de hembras de *Ornithodoros moubata*, en ayunas y a las 48 horas de la toma de sangre (Alim), implicadas en el metabolismo y transporte de lípidos. (T) proteína también identificada en el transcriptoma del intestino de *O. moubata*. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 10. Proteínas identificadas en el intestino de hembras de *Ornithodoros moubata*, en ayunas y 48 horas después de la toma de sangre (Alim), implicadas en procesos de

endocitosis y transporte intracelular. (T) proteína identificada en el transcriptoma del intestino de *O. moubata*. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 11. Proteínas identificadas en el intestino de hembras de *Ornithodoros moubata*, en ayunas y a las 48 horas de la toma de sangre (Alim), implicadas en las respuestas al estrés asociadas a la digestión sanguínea. (T) proteína identificada en el transcriptoma del Intestino de *O. moubata*. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 12. Proteínas antigénicas potencialmente protectoras seleccionadas como candidatos vacunales. TM, número de dominios transmembrana; MP, expresión en la membrana plasmática; PROT, identificada en el proteoma. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 13. Secuencias codificantes completas (ADNc) de los genes Om99, Om86, Om29, Om28, Om17 y Om03. Entre paréntesis: longitud en pares de bases. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 14. Secuencias de aminoácidos de las proteínas Om99, Om86, Om85, Om29, Om28, Om17 y Om03, seleccionadas como candidatos antigénicos. En rojo negrita se señala el péptido señal (en la Om86) y en negrita subrayado los dominios transmembrana. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 15. Longitud en aminoácidos (aa), punto isoelectrico (*pI*), peso molecular en kDa (PM) y presencia/ausencia de péptido señal, de dominios transmembrana (TM), de señales de secreción no clásica y de anclajes tipo GPI en las proteínas Om99, Om86, Om85, Om29, Om28, Om17 y Om03. Entre paréntesis se indican las posiciones aminoacídicas ocupadas por el péptido señal en la Om86 y por los dominios transmembrana en todas ellas. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 16. Nombre y secuencia de los péptidos sintéticos diseñados sobre el dominio extracelular amino-terminal de las proteínas O99, Om85 y Om03. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 17. Eficacia vacunal frente a *Ornithodoros moubata*. Parámetros evaluados en los ejemplares alimentados sobre los conejos control o vacunados con los antígenos recombinantes rOm86 y rOm17 en las dos infestaciones. Los resultados son la media \pm desviación estándar de cada grupo y entre paréntesis se indica el porcentaje de reducción en ese parámetro respecto al control (o incremento en el caso de la tasa de mortalidad). Las medias entre los grupos vacunados y el control se compararon mediante un test ANOVA de una vía y el test de la *t* de Dunnett. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 18. Eficacia vacunal frente a *Ornithodoros erraticus*. Parámetros evaluados en los ejemplares alimentados sobre los conejos control o vacunados con los antígenos recombinantes rOm86 y rOm17 en las dos infestaciones. Los resultados son la media \pm desviación estándar de cada grupo y entre paréntesis se indica el porcentaje de reducción en ese parámetro respecto al control (o incremento en el caso de la tasa de mortalidad).

Índice de Tablas

Las medias entre los grupos vacunados y el control se compararon mediante un test ANOVA de una vía y el test de la t de Dunnett. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 19. Eficacia vacunal frente a *Ornithodoros moubata*. Parámetros evaluados en los ejemplares alimentados sobre los conejos control o vacunados con los péptidos OM99, OM85 y OM03. Los resultados son la media \pm desviación estándar de cada grupo y entre paréntesis se indica el porcentaje de reducción en ese parámetro respecto al control (o incremento en el caso de la tasa de mortalidad). Las medias entre los grupos vacunados y el control se compararon mediante un test ANOVA de una vía y el test de la *t* de Dunnett. El grupo control fue tratado con KLH; los grupos 2, 3 y 4 fueron inmunizados con OM99-KLH, OM85-KLH y OM03-KLH, respectivamente. **Error! Marcador no definido.**

Tabla 3. 20. Eficacia vacunal frente a *Ornithodoros erraticus*. Parámetros evaluados en los ejemplares alimentados sobre los conejos control o vacunados con los péptidos OM99, OM85 y OM03. Los resultados son la media \pm desviación estándar de cada grupo y entre paréntesis se indica el porcentaje de reducción en ese parámetro respecto al control (o incremento en el caso de la tasa de mortalidad). Las medias entre los grupos vacunados y el control se compararon mediante un test ANOVA de una vía y el test de la *t* de Dunnett. El grupo control fue tratado con KLH; los grupos 2, 3 y 4 fueron inmunizados con OM99-KLH, OM85-KLH y OM03-KLH, respectivamente. **Error! Marcador no definido.**

Figura 1. Transcriptoma del intestino medio de hembras de *Ornithodoros moubata*. Clasificación de los transcritos/proteínas anotadas por Función Molecular (A) y por Proceso Biológico (B). Los gráficos sólo incluyen las categorías representadas por al menos 30 genes. Los números entre paréntesis indican el número de transcritos en cada categoría. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2. Genes diferencialmente expresados (DEG) en el intestino de las hembras alimentadas de *O. moubata*. En abscisas se representa el nivel de expresión de los DEG y en ordenadas el cambio en su nivel de expresión (Log fold change) respecto a las hembras en ayunas (condición basal). Cada punto representa un gen y los que experimentaron un cambio de expresión significativo ($\log \text{fold change} > 2$ ó < -2 ; $p < 0,05$) se representan en rojo. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 3. Genes diferencialmente expresados en el intestino de las hembras alimentadas de *O. moubata* respecto a las hembras en ayunas. Distribución de la variación en el nivel de expresión de los genes sobre-expresados (barras azules) y de los genes sub-expresados (barras rojas). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 4. Familias de dominios proteicos (Pfam) más representativas en los genes diferencialmente expresados en el intestino medio de *O. moubata*. Las barras negras representan el número de genes sobre-expresados en cada familia; las barras blancas representan el número de genes sub-expresados en cada familia. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 5. Clasificación por función molecular (A) y por proceso biológico (B) de los genes anotados y diferencialmente expresados en el intestino medio de hembras alimentadas de *Ornithodoros moubata*. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 6. Niveles de expresión de los genes Om99, Om86, Om29, Om28, Om17 y Om03 en garrapatas en ayunas (barras rojas) y garrapatas a las 48 h.p.a. (barras azules), medidos por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) y por RNA-seq. El nivel de expresión de cada gen se normalizó (dividió) por su nivel en garrapatas en ayunas y se representó en forma de *fold change* para ambos métodos. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 7. Gel de poliacrilamida al 5-20% en Tris-glicina teñido con Sypro Ruby con las fracciones de proteína soluble (S) y de membrana (M) del intestino medio de hembras de *Ornithodoros moubata* antes de alimentarse (S-0, M-0) y a las 48 horas post-alimentación (S-1, M-1). A la derecha se muestran los 10 fragmentos en que se dividió cada carril. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 8. Número de proteínas identificadas en las fracciones del intestino medio de hembras de *O. moubata* en ayunas y alimentadas tomadas a las 48 h.p.s., en cada una de las bases de datos interrogadas. **¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 9.** Clasificación según la Función Molecular (Gene Ontology) de las proteínas identificadas en cada una de las fracciones intestinales obtenidas de garrapatas en ayunas (S-0, M-0) y alimentadas (S-1, M-1). Se consideran únicamente las categorías con más de 5 proteínas. El porcentaje en cada categoría es la proporción entre el número de proteínas en cada categoría, que se indica entre paréntesis, y el total de las identificadas en esa fracción..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 10.** Clasificación según el Proceso Biológico (Gene Ontology) de las proteínas identificadas en cada una de las fracciones intestinales obtenidas de garrapatas en ayunas (S-0, M-0) y alimentadas (S-1, M-1). Se consideran únicamente las categorías con más de 5 proteínas. El porcentaje en cada categoría es la proporción entre el número de proteínas en cada categoría, que se indica entre paréntesis, y el total de las identificadas en esa fracción..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 11.** (A) Número de proteínas de *Ornithodoros moubata* identificadas en el intestino de hembras en ayunas y alimentadas (alim). (B) Clasificación de las proteínas utilizando el sistema PANTHER. Sólo se han incluido las categorías con más de 5 proteínas...**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 12.** Clasificación de las proteínas identificadas en el intestino medio de hembras de *O. moubata* sin alimentar (barras azules, *unfed*) y a las 48 horas post-alimentación (barras rojas, *fed*). Función Molecular (A) y Proceso Biológico (B) asignado en la base de datos de Gene Ontology. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 13.** Filtrado de las proteínas inmunogénicas, asociadas a membranas y sobre-expresadas a las 48 horas post-alimentación y selección de candidatos vacunales para su producción (en forma recombinante o por síntesis química) y evaluación en pruebas de inmunización de animales. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 14.** Productos de la amplificación por RT-PCR del ADNc codificante de los genes Om99, Om86, Om29, Om28, Om17 y Om03. Entre paréntesis se indica el tamaño del fragmento diana en pares de bases. El recuadro señala la banda correspondiente al producto de PCR esperado. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 15.** (A) Secuencias ADNc del gen Om85 obtenidas por RT-PCR y por RNA-seq. Los nucleótidos idénticos en ambos ADNc se han marcado en rojo y los fragmentos adicionales del ADNc obtenido por PCR en negro. Los codones de inicio y de terminación de ambos marcos de lectura se destacan en amarillo. (B) Secuencias de aminoácidos de los dos polipéptidos Om85. En rojo los aminoácidos idénticos y en negro los diferentes. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 16. Predicciones topológicas para los 7 candidatos vacunales. (A) Proteínas Om86, Om29, Om28 y Om17: la mayor parte de la longitud de estas proteínas es extracelular o, al menos, presentan un dominio extracelular de más de 100 aminoácidos (recuadros color naranja). (B) Proteínas Om99, Om85 y Om03: la mayor parte de la longitud de estas proteínas es transmembrana/intracelular y sólo exponen en la parte extracelular un dominio amino-terminal corto, de 24 a 32 aminoácidos (recuadros verdes). Para la Om85 también se muestra la topología de la secuencia obtenida por RNA-seq, donde se puede ver el dominio carboxi-terminal teórico, ausente de la secuencia obtenida por PCR (tachado)..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 17. Amplificación por PCR de los ADNc codificantes de los dominios extracelulares rOm86, rOm29, rOm28 y rOm17. Entre paréntesis se indica el tamaño del fragmento diana en pares de bases. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 18. Expresión y purificación de rOm17. Gel de poliacrilamida al 15 % teñido con azul Coomassie. PM, marcador de pesos moleculares, valores expresados en kDa. Lisado celular antes de la inducción (No Ind.) y sobrenadante (S) y sedimento (P) del lisado celular después de la inducción con IPTG y sobrenadante y sedimento de la solubilización con sarcosil al 10%. rOm17 proteína recombinante purificada por cromatografía de afinidad a partir del sobrenadante de sarcosil 10%.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 19. Expresión y purificación de rOm86. Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con azul Coomassie. PM, marcador de pesos moleculares, valores expresados en kDa. Lisado celular antes de la inducción (No Ind.). Sobrenadante (S) y sedimento (P) del lisado celular después de la inducción con IPTG y sobrenadante y sedimento representativos tras la solubilización del sedimento del lisado celular con sarcosil 10%, Urea 8M, urea 8M + 20 mM 2-mercaptoetanol y urea 8M + 5 mM DTT. La rOm86 se señala en ambos sedimentos con un recuadro amarillo. El carril de la derecha muestra la rOm86 purificada por electroelución a partir del sedimento del lisado celular.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura 20. Predicción de epítomos B lineales en el dominio extracelular amino-terminal de las proteínas Om99, Om85 y Om03 utilizando las aplicaciones ABCpred (aminoácidos en amarillo), Bcepred (aminoácidos en azul) y BepiPred-2.0 (aminoácidos en verde). Los aminoácidos con predicción de antigenicidad por al menos dos de estas tres aplicaciones se han incluido dentro de un recuadro. En la fila inferior de cada secuencia se indica la predicción topológica: o (outside), extracelular; M, transmembrana; i, intracelular. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 21. ELISA. Niveles séricos de IgG ($DO_{492\text{ nm}}$ media \pm desviación estándar) en los conejos control (PBS) y en los vacunados con las proteínas recombinantes rOm86 y rOm17: (A) frente a cada recombinante; (B) frente a saliva de *Ornithodoros moubata* y

Ornithodoros erraticus. Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preimmune) y a los 14 y 28 días post-inmunización (d.p.i.), inmediatamente antes de cada infestación, y se utilizaron diluidos 1/300. ¡Error! Marcador no definido.

Figura 22. Western blot: antígenos reconocidos por los sueros inmunes de los conejos vacunados con las proteínas recombinantes rOm86 (C4, C5, C6) y rOm17 (C7, C8, C9) y por una mezcla de sueros preinmunes (P) de esos mismos conejos sobre ambas proteínas recombinantes. Chap: proteína chaperona co-purificada con la recombinante. PM, marcador de pesos moleculares expresados en kDa. Geles al 15% en Tris-glicina. ¡Error! Marcador no definido.

Figura 23. ELISA. Niveles séricos de IgG ($DO_{492\text{ nm}}$ media \pm desviación estándar), en los conejos control (pbs) y en los vacunados con las proteínas recombinantes rom86 y rom17, frente a extractos proteicos del intestino medio de hembras de *Ornithodoros moubata* tomadas antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preimmune) y a los 14 y 28 días post-inmunización (d.p.i.), inmediatamente antes de cada infestación, y se utilizaron diluidos 1/300. ¡Error! Marcador no definido.

Figura 24. ELISA. Niveles séricos de IgG ($DO_{492\text{ nm}}$ media \pm desviación estándar), en los conejos control (pbs) y en los vacunados con las proteínas recombinantes rom86 y rom17, frente a extractos proteicos del intestino medio de hembras de *Ornithodoros erraticus* tomadas antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preimmune) y a los 14 y 28 días post-inmunización (d.p.i.), inmediatamente antes de cada infestación, y se utilizaron diluidos 1/300. ¡Error! Marcador no definido.

Figura 25. (A) Gel de poliacrilamida al 15% en Tris-glicina teñido con azul de Coomassie mostrando los extractos de proteínas solubles (S) y de membrana (M) del intestino medio de hembras de *Ornithodoros moubata* antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). (B) Western blot: antígenos reconocidos sobre dichos extractos por los sueros de los conejos vacunados con las proteínas recombinantes rOm86 y rOm17. Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preimmune) y a los 14 días post-inmunización (anti-rOm86 y anti-rOm17). Flecha roja: proteína Om86 nativa; flecha azul: IgG (cadena pesada) del hospedador. ¡Error! Marcador no definido.

Figura 26. (A) Gel de poliacrilamida al 15% en Tris-glicina teñido con azul de Coomassie mostrando los extractos de proteínas solubles (S) y de membrana (M) del intestino medio de hembras de *Ornithodoros erraticus* antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). (B) Western blot: antígenos reconocidos sobre dichos extractos por los sueros de los conejos vacunados con las proteínas recombinantes rOm86 y rOm17. Los sueros se tomaron antes de la administración de la

vacuna (preinmune) y a los 14 días post-inmunización (anti-rOm86 y anti-rOm17). Flecha roja: posible ortólogo en *O. erraticus* de la proteína Om86; flecha azul: IgG (cadena pesada) del hospedador. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 27. Eficacia vacunal (%) de los antígenos recombinantes rom86 y rom17 frente a *O. moubata* y *O. erraticus* en ambas infestaciones: $e = 100 (1 - s \times f)$, donde s y f representan, respectivamente, el índice de supervivencia y de reproducción de las hembras alimentadas sobre los conejos vacunados respecto a las alimentadas sobre el grupo control. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 28. ELISA. Niveles séricos de IgG (DO492 nm media \pm desviación estándar), en los conejos control (inmunizados con KLH) y en los vacunados con los péptidos sintéticos OM99, OM85 y OM03 conjugados con KLH, frente a cada uno de los péptidos sintéticos. Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preinmune) y a los 14 y 28 días post-inmunización (d.p.i), antes de cada inmunización, y se utilizaron diluidos a 1/300. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 29. ELISA. Niveles séricos de IgG (DO492 nm media \pm desviación estándar), en los conejos control (PBS) y en los vacunados con los péptidos sintéticos OM99, OM85 y OM03 conjugados con KLH, frente a saliva de *Ornithodoros moubata* y *O. erraticus*. Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preinmune) y a los 14 y 28 días post-inmunización (d.p.i.), inmediatamente antes de cada infestación, y se utilizaron diluidos a 1/300. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 30. ELISA. Niveles séricos de IgG (DO492 nm media \pm desviación estándar), en los conejos control (inmunizados con KLH) y en los vacunados con los péptidos sintéticos OM99, OM85 y OM03 conjugados con KLH, frente a extractos proteicos del intestino medio de hembras de *Ornithodoros moubata* tomadas antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preinmune) y a los 14 y 28 días post-inmunización (d.p.i.), inmediatamente antes de cada infestación, y se utilizaron diluidos a 1/300. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 31. ELISA. Niveles séricos de IgG (DO₄₉₂ nm media \pm desviación estándar), en los conejos control (KLH) y en los vacunados con los péptidos sintéticos OM99, OM85 y OM03 conjugados con KLH, frente a extractos proteicos del intestino medio de hembras de *Ornithodoros erraticus* tomadas antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preinmune) y a los 14 y 28 días post-inmunización (d.p.i.), inmediatamente antes de cada infestación, y se utilizaron diluidos a 1/300. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 32. (A) Gel de poliacrilamida al 15% en Tris-tricina teñido con azul de Coomassie: extractos de proteínas solubles (S) y de membrana (M) del intestino medio de hembras de *Ornithodoros moubata* antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). (B-F) Western blot: antígenos reconocidos sobre dichos

extractos por los sueros preinmunes y por los sueros de los conejos vacunados con KLH y con los péptidos sintéticos OM99, OM85 y OM03 conjugados con KLH. Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preinmune) y a los 14 días post-inmunización (anti-KLH, anti-OM99, anti-OM85 y anti-OM03). Flecha azul: IgG (cadena pesada) del hospedador. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 33. (A) Gel de poliacrilamida al 15% en Tris-tricina teñido con azul de Coomassie: extractos de proteínas solubles (S) y de membrana (M) del intestino medio de hembras de *Ornithodoros erraticus* antes de alimentarse (ayunas) y a las 48 horas post-alimentación (48 h.p.a.). (B-F) Western blot: antígenos reconocidos sobre dichos extractos por los sueros preinmunes y por los sueros de los conejos vacunados con KLH y con los péptidos sintéticos OM99, OM85 y OM03 conjugados con KLH. Los sueros se tomaron antes de la administración de la vacuna (preinmune) y a los 14 días post-inmunización (anti-KLH, anti-OM99, anti-OM85 y anti-OM03). Flecha roja: proteína de *O. erraticus* homóloga a la Om85. Flecha azul: IgG (cadena pesada) del hospedador. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 34. Eficacia vacunal (%) de los péptidos OM99, OM85 y OM03 frente a *O. moubata* y *O. erraticus* en ambas infestaciones: $E = 100 (1 - S \times F)$, donde S y F representan, respectivamente, el índice de supervivencia y de reproducción de las hembras alimentadas sobre los conejos vacunados respecto a las alimentadas sobre el grupo control. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 35. Eficacia vacunal (%) de las proteínas recombinantes rOm86 y rOm17 y de los péptidos OM99, OM85 y OM03 frente a *O. moubata* y *O. erraticus* en ambas infestaciones. **¡Error! Marcador no definido.**

Introducción

1. Características biológicas de las garrapatas.

Las garrapatas son ectoparásitos temporales y hematófagos obligados de vertebrados terrestres, incluyendo anfibios, reptiles, aves y mamíferos.

Zoológicamente, las garrapatas son ácaros pertenecientes al Orden Parasitiformes y Suborden Ixodida. Las especies conocidas están en torno a 907 y se clasifican en 2 grandes familias, Ixodidae y Argasidae, las cuales muestran entre sí importantes diferencias morfológicas y biológicas. Existe una tercera familia, Nuttalliellidae, cuya única especie (*Nuttalliella namaqua*) posee simultáneamente características de las otras dos familias, por lo que es considerada el puente de unión entre ambas (Hoogstraal, 1985; Barker y Murrell, 2008; Latif et al., 2012; Manzano-Román et al., 2012a).

Los ixódidos son generalmente exófilos, ya que permanecen la mayor parte de su vida en el suelo o en la vegetación a la espera de encontrar un hospedador adecuado para alimentarse. Tras acceder a dicho hospedador, se alimentan durante varios días e ingieren cantidades de sangre superiores a 100 veces su peso, salvo los machos, que apenas se alimentan o no lo hacen en absoluto. Una vez repletas, vuelven al suelo, donde realizan la muda, si son inmaduros, o la oviposición si son hembras. Las hembras de los ixódidos se alimentan sólo una vez y mueren tras depositar varios miles de huevos (Sonenshine et al., 2002; Mans y Neitz, 2004).

Los argásidos, por el contrario, suelen ser endófilos/nidícolas. En la naturaleza se refugian en el interior de las madrigueras de sus hospedadores y en el medio antrópico colonizan las viviendas humanas y los establos de los animales domésticos. Allí viven protegidos de unas condiciones ambientales adversas y tienen garantizado un acceso regular a sus hospedadores. Su alimentación es rápida; normalmente tardan menos de una hora e ingieren cantidades de sangre equivalentes a unas 10 veces su peso. Una vez alimentados, mudan y se reproducen en el interior de sus refugios. Los argásidos adultos pueden repetir el ciclo trofogónico hasta 10 veces, depositando entre 100 y 200 huevos en cada ciclo. Además, los argásidos son muy resistentes al ayuno y pueden sobrevivir durante años sin alimentarse (Oleaga-Pérez et al., 1990; Vial, 2009).

2. Importancia sanitaria de las garrapatas blandas del género *Ornithodoros*.

Las garrapatas son vectores hematófagos de enorme importancia médica y veterinaria por los daños directos que producen sus parasitismos, incluyendo anemia, parálisis, toxicosis, irritación, alergias y destrucción tisular (Jongejan & Uilenberg, 2004; Jones et al., 2008). Pero, sobre todo, son importantes porque transmiten numerosos y variados patógenos, como virus, bacterias, protozoos y helmintos, que causan enfermedades al ganado, a los animales de compañía y a las personas (de la Fuente et al., 2008; Manzano-Román et al., 2012).

Entre los argásidos, varias especies del género *Ornithodoros* destacan por ser transmisoras de dos enfermedades graves como son la Fiebre recurrente humana y la Peste porcina africana (Manzano-Román et al., 2012a).

La fiebre recurrente humana transmitida por garrapatas o *Tick-Borne Relapsing Fever* (TBRF) se caracteriza por episodios febriles recurrentes acompañados por síntomas menos específicos como cefalea, artralgia, mialgia, escalofríos y dolor abdominal. Según la localización geográfica, la TBRF es producida por diferentes especies de espiroquetas del género *Borrelia* y es transmitida por distintas especies de *Ornithodoros*. En África oriental y del sur es producida por *Borrelia duttoni* y transmitida por *Ornithodoros moubata*. En algunos países de este área, como Tanzania o Ruanda, la TBRF es hiperendémica, alcanzando incidencias anuales de hasta 384/1.000 en niños menores de 1 año, con tasas de mortalidad perinatal de hasta un 43,6% y de hasta un 16% en mujeres embarazadas (Cutler, 2006, 2010; Cutler et al., 2009; Trape et al., 2013). En Eurasia y América esta enfermedad es mucho más esporádica y afecta a las personas que penetran en hábitats infestados por ornithodoros como cuevas, edificios en ruinas o refugios de animales. En la cuenca Mediterránea y Oriente Medio, la TBRF es producida esencialmente por las especies *Borrelia hispanica* y *Borrelia crocidurae*, las cuales son transmitidas por garrapatas del complejo *Ornithodoros erraticus* (Cutler, 2006, 2010; Rebaudet and Parola, 2006 Diatta et al., 2012; Trape et al., 2013).

Por su parte, la Peste porcina africana (PPA) es una enfermedad viral de curso agudo, hemorrágica y febril, con tasas de mortalidad de hasta el 100%, que limita la producción porcina y provoca enormes pérdidas económicas en los países afectados. La enfermedad se originó en África, desde donde se extendió a Europa a mediados del siglo XX y más tarde a Sudamérica y el Caribe. En Europa (salvo en Cerdeña) y en el continente americano fue erradicada a finales del siglo pasado. Lamentablemente, en 2007 la enfermedad apareció en Georgia y desde allí se ha extendido rápidamente hacia otros países del Cáucaso, la Federación Rusa y el Este de Europa y, más recientemente, a la Unión Europea a través de su frontera este (OIE WAHIS, http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home, noviembre 2016). No existe tratamiento ni vacuna frente a la PPA, lo cual limita las posibilidades de control de la enfermedad y hace más necesario, si cabe, el control de sus vectores que en África y Eurasia son, principalmente, *O. moubata* y *O. erraticus* (Costard et al., 2013; Penrith et al., 2013; Sánchez-Vizcaíno et al., 2012, 2015).

Ornithodoros moubata se encuentra ampliamente distribuido por los países del este, centro y sur de África (Vial, 2009; Quembo et al., 2016). En estos países se encuentra tanto en el medio natural, asociado a facoqueros y otros animales habitantes de madrigueras, como en el medio antrópico, donde coloniza las viviendas humanas y las dependencias animales, haciendo de las personas y los cerdos domésticos sus principales hospedadores. En algunos distritos de Tanzania entre el 60% y el 80% de las viviendas humanas están colonizadas por *O. moubata* (Cutler, 2010).

O. erraticus es la especie tipo del denominado “complejo *O. erraticus*”, que se distribuye por toda la Cuenca Mediterránea. En el norte de África vive asociado a micromamíferos habitantes de madrigueras, mientras que en los países del sur de Europa vive asociado a los cerdos domésticos en explotaciones porcinas en extensivo, en las cuales se refugia en agujeros del interior y de las inmediaciones de las zahúrdas (Oleaga-Pérez et al., 1990; Manzano-Román et al., 2007; Trape et al., 2013; Boinas et al., 2014). Además, el

complejo *O. erraticus* también engloba las especies *O. alactagalis*, *O. asperus*, *O. pavlovskyi*, *O. tartakovskyi*, *O. tholozani* y *O. lahorensis*, las cuales se distribuyen por Oriente Medio, el Cáucaso y la Federación Rusa, coincidiendo en parte con las zonas donde la PPA se ha extendido incontroladamente en los últimos años. Se teme que estas especies puedan ser vectores competentes para la PPA, aunque esto aun no se ha demostrado experimentalmente. De ser así, podrían influir enormemente en la transmisión y persistencia a largo plazo de la PPA en esa amplia región (EFSA panel, 2010a, 2010b, 2010c).

En suma, la presencia de *O. moubata* y *O. erraticus* en el medio antrópico contribuye a la persistencia de la TBRF y la PPA en las zonas endémicas, dificultando enormemente la erradicación de estas enfermedades. También agrava la constante amenaza de reintroducción, propagación y mantenimiento de la PPA en países de los que ya había sido erradicada, como España y Portugal, o en países donde nunca ha estado presente (Costard et al., 2013; Wilson et al., 2013; Boinas et al., 2014; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; Quembo et al., 2016).

En consecuencia, la eliminación de, al menos, las poblaciones sinantrópicas de estos argásidos facilitaría el control y prevención de las enfermedades que transmiten. Este objetivo es teóricamente factible, pero para alcanzarlo se necesita conocer con precisión los lugares infestados por los argásidos y, al mismo tiempo, disponer de métodos eficaces para eliminar la garrapata de dichos lugares.

3. Vigilancia epidemiológica: métodos de localización de poblaciones del género *Ornithodoros*.

Los métodos de búsqueda directa utilizados en la localización de poblaciones de ixódidos, que se basan en la captura e identificación de ejemplares en la vegetación o sobre animales infestados, no sirven para los ornithodoros.

Dada la naturaleza endófila/nidícola de estos argásidos y la brevedad de sus contactos con el hospedador, que además suelen ser nocturnos, es improbable el hallazgo de ejemplares de ornithodoros en el medio exterior o sobre sus hospedadores. En consecuencia, para encontrarlos hay que buscarlos en el interior de sus refugios hipogeos y esto hace que la localización de sus poblaciones, en una determinada región o país, sea una tarea difícil y laboriosa.

Pese a lo anterior, llegar a identificar los lugares infestados con ornithodoros es un objetivo relativamente asequible gracias a los métodos de búsqueda disponibles en la actualidad.

En estudios a pequeña escala -en áreas reducidas o en focos muy concretos- la localización de poblaciones de ornithodoros puede efectuarse eficazmente mediante la búsqueda directa del parásito en el terreno utilizando trampas de dióxido de carbono o examinando muestras de tierra de los posibles refugios (Oleaga-Pérez et al., 1990; Jori et al., 2013; Boinas et al., 2014).

Por el contrario, en estudios a mayor escala este tipo de examen directo es inviable, ya que requeriría la exploración exhaustiva de los innumerables lugares en los que las garrapatas pueden estar refugiadas antes de poder considerar al área estudiada libre del parásito.

En su lugar, la aplicación de métodos serológicos, basados en la detección de anticuerpos anti-garrapata en los hospedadores que viven en el área estudiada, ofrece una alternativa rápida y eficaz (Pérez-Sánchez et al., 2010).

Con ese propósito, nuestro equipo desarrolló un primer test de ELISA para el diagnóstico serológico de *O. erraticus* en España, utilizando como antígeno un extracto soluble de las glándulas salivales del parásito (SGE). El test permitía detectar anticuerpos anti-garrapata desde las 2 semanas tras un contacto primario hasta al menos 3 meses después de contactos secundarios en cerdos picados por tan sólo 10 ejemplares (Canals et al., 1990; Pérez-Sánchez et al., 1992). Sin embargo, en las pruebas de campo este test mostró cierto grado de inespecificidad por epítomos glicosilados, la cual pudo eliminarse desglicosilando el SGE con metaperiodato sódico (Oleaga-Pérez et al., 1994). El nuevo test mejorado se utilizó entonces para el análisis de 19.000 sueros porcinos procedentes de 3.478 granjas localizadas en 234 municipios de la provincia de Salamanca. Este análisis permitió la identificación de las granjas infestadas por el parásito en esa provincia y el establecimiento de una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *O. erraticus* y la persistencia de la PPA en dichas granjas (Pérez-Sánchez et al., 1994). Este conocimiento facilitó la adopción de medidas específicas de control para evitar el contacto entre los cerdos y las garrapatas en las granjas infestadas, contribuyendo a la erradicación de la PPA de la zona analizada.

Posteriormente, nuestro equipo desarrolló un test similar basado en el SGE de *O. moubata* para la detección de poblaciones de esta garrapata en África (Baranda et al., 1997, 2000). El test se aplicó por primera vez en estudios de campo en Madagascar en una zona endémica de PPA, durante el periodo 2006-2007, mostrando una buena sensibilidad, pero también cierto grado de inespecificidad ya que en algunas granjas donde los cerdos dieron positivo no se encontraron ejemplares de *O. moubata* (Ravaomanana et al., 2011).

Estos trabajos mostraron que el SGE era un antígeno válido y sensible para la detección por serología de los cerdos picados por los ornithodoros, pero que no está exento de inconvenientes, como su obtención laboriosa y difícil de estandarizar y su composición compleja y poco conocida, que puede plantear dudas acerca de su especificidad. Una alternativa al SGE sería el uso de antígenos salivales individuales, de probada sensibilidad y especificidad, producidos en forma recombinante.

Teniendo presente ese objetivo, en trabajos posteriores se purificaron los 4 antígenos inmunodominantes del SGE de *O. erraticus* y de *O. moubata* y se evaluó individualmente su eficacia diagnóstica, identificando al más sensible y específico de cada especie, que, en concreto, fueron el Oe260 de *O. erraticus* y la lipocalina TSGP1 de *O. moubata* (Baranda et al., 2000; Oleaga et al., 2007). Más recientemente, Díaz-Martín et al. (2011) desarrolló un

nuevo test serológico para *O. moubata* basado en una forma recombinante de TSGP1, que detecta los animales parasitados por *O. moubata* con un 100% de sensibilidad y 99% de especificidad. La aplicación de este test permite la delimitación de focos infestados por *O. moubata* (poblados, granjas, corrales o cercados), hacia los cuales se puede dirigir entonces la búsqueda directa del parásito para confirmar los resultados de la serología. Este test se ha aplicado por primera vez con éxito en estudios de campo en Mozambique (Quembo et al., 2016).

4. Métodos de control de *Ornithodoros*.

El control de los parasitismos por garrapatas es un problema complejo que aún no se ha resuelto debido a que ninguno de los métodos de control anti-garrapata utilizados hasta ahora han sido completamente eficaces (Manzano-Román et al., 2012a; de la Fuente y Contreras, 2015).

El control de las poblaciones de garrapatas se basa substancialmente en el empleo de diversos acaricidas químicos. Pero el uso de estos productos presenta graves inconvenientes, como la contaminación ambiental y de los productos de origen animal, así como el rápido desarrollo de resistencias frente a ellos, lo cual limita su utilidad y vida media en el mercado (George et al., 2004; Graf et al., 2004; Ghosh et al., 2007; Guerrero et al., 2012; de la Fuente y Contreras, 2015). Además, en relación con los ornithodoros, a éstos inconvenientes hay que añadir el qué la aplicación de acaricidas en las viviendas humanas y las dependencias de los animales resulta ineficaz por el simple hecho de que los acaricidas no alcanzan a los parásitos en el interior de sus refugios (Astigarraga et al., 1995).

Dichos inconvenientes, junto con el elevado coste del desarrollo y comercialización de nuevos acaricidas, han estimulado la búsqueda de métodos alternativos para el control de garrapatas, incluyendo las vacunas anti-garrapata y diversos métodos de control biológico con agentes como parasitoides, predadores y organismos entomopatógenos como hongos, bacterias y nematodos (Samish et al., 2008).

De todos los agentes biológicos citados, los únicos que se han probado hasta la fecha frente a los argásidos han sido los hongos entomopatógenos (Samish et al., 2008). Estos agentes, y más concretamente las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, han demostrado ser eficaces frente a las garrapatas, tanto en estudios de laboratorio como en estudios de campo, aunque la mayor parte de los estudios de ese tipo ha sido dirigida al control de ixódidos y no al de argásidos (Fernandes and Bittencourt, 2008; Ment et al., 2013; Polar et al., 2008; Ren et al., 2014).

Los escasos estudios dirigidos hacia el control de los argásidos son los que se citan a continuación. En primer lugar, los trabajos de Sewify y Habib (2001) y Habib y Sewify (2002), que analizaron el efecto patogénico de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en *Argas persicus*. Para ello pulverizaron gallineros densamente infestados por el argásido con suspensiones de esporas y observaron que la población parasitaria desaparecía en 3 semanas. También el trabajo de Pourseyed et al. (2010), que consiguió 100% de mortalidad entre las larvas y

hembras de *A. persicus* tratadas con *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio. Y, por último, los trabajos llevados a cabo por Zabalgogezcoa et al. (2008) y Herrero et al. (2011), en los que observaron que, en condiciones de laboratorio, varios aislados de *B. bassiana* y *Tolypocladium cylindrosporum* provocaban hasta un 70% de mortalidad en *O. erraticus* y hasta un 40% en *O. moubata*. Estos resultados sugieren la posibilidad de desarrollar cepas de hongos entomopatógenos como agentes eficaces para el control biológico de los argásidos (Manzano-Román et al., 2012a).

Por su parte, el control inmunológico mediante vacunas anti-garrapata parece una alternativa aún más atractiva que el control biológico a la hora de reemplazar o complementar el uso de acaricidas químicos. Durante los años 90 del siglo XX se desarrollaron y comercializaron las dos primeras vacunas anti-garrapata: TickGARD® en Australia y GAVAC® en Latinoamérica. Ambas están dirigidas frente al ixódido *Rhipicephalus microplus* y se basan en el antígeno Bm86, que es una glicoproteína expresada en la superficie luminal de los enterocitos del intestino medio, no expuesta al sistema inmunitario del hospedador durante los contactos naturales y, por tanto, considerada como antígeno oculto (Willadsen, 2008).

Aunque con eficacia variable, la aplicación de estas vacunas a lo largo de las dos últimas décadas demostró que la vacunación de hospedadores es un método sostenible de control de las poblaciones de garrapatas y que su implementación en programas de control integrado permite disminuir el uso de acaricidas. Esto, a su vez, reduce el costo de los tratamientos y la probabilidad de aparición de resistencias, prolongando la vida media de los acaricidas químicos en el mercado (de la Fuente et al., 2007; Willadsen, 2008; Vargas et al., 2010; Guerrero et al., 2012).

Pese a lo anterior y a la intensa actividad investigadora llevada a cabo en este campo en los últimos 20 años, en especial con los ixódidos, el desarrollo de nuevas vacunas anti-garrapata más eficaces ha sido mucho más lento de lo previsto y, de hecho, aun no se ha comercializado ninguna vacuna nueva. La principal causa de ese retraso ha sido la dificultad para la identificación de nuevos antígenos protectores más eficaces (Willadsen, 2008; Guerrero et al., 2012). Como resultado, actualmente se dispone de un repertorio de candidatos vacunales bastante limitado, la mayor parte de los cuales se han identificado en especies de ixódidos (Willadsen, 2008; Guerrero et al., 2012; Parizi et al., 2012; Merino et al., 2013; de la Fuente et al., 2016; Lew-Tabor y Rodríguez Valle, 2016).

En los argásidos el número de candidatos vacunales identificados es aún menor, por lo que urge identificar nuevos antígenos protectores que permitan el desarrollo de vacunas anti-garrapata más eficaces.

Con ese objetivo, en los siguientes apartados de este capítulo, se definen las características que debería reunir el antígeno ideal para desarrollar una vacuna anti-garrapata eficaz; se revisan los estudios efectuados hasta ahora para identificar antígenos protectores para el desarrollo de vacunas anti-argásidos; y, finalmente, se comentan las nuevas estrategias

de vacunología reversa utilizadas para identificar y validar nuevos candidatos vacunales frente a garrapatas.

5. Definición del antígeno ideal para el desarrollo de vacunas anti-garrapata.

Existe un amplio consenso en cuanto a la urgente necesidad de identificar nuevos antígenos que amplíen el actual repertorio de candidatos vacunales y, también, en relación con las características que debería reunir el antígeno óptimo para una vacuna anti-garrapata (de la Fuente et al., 2011; de la Fuente, 2012; Flower et al., 2010; Guerrero et al., 2012; Maritz-Olivier et al., 2012; Moreno-Cid et al., 2013; Parizi et al., 2012; Wikel, 2013; de la Fuente y Contreras, 2015).

Dicho antígeno debería reunir el mayor número posible de los siguientes atributos:

1. Ser accesible a los efectores inmunes del hospedador ingeridos con la sangre, que son básicamente los anticuerpos y el complemento. En este sentido, las proteínas salivales (antígenos expuestos) y las de la membrana luminal del intestino medio de la garrapata (antígenos ocultos) son candidatos de primera elección. Además, dado que las inmunoglobulinas del hospedador pueden pasar desde la luz intestinal a la hemolinfa de la garrapata (Chinzei and Minoura, 1988; Nuttall et al., 2006), los antígenos ocultos expresados en la superficie hemocélica de los órganos internos también podrían ser candidatos vacunales.

Los antígenos salivales tendrían la ventaja de que muchos de ellos inducen respuestas inmunitarias durante los contactos naturales y, por tanto, en los hospedadores vacunados con estos antígenos las infestaciones naturales actuarían como potenciadoras de la respuesta. Sin embargo, algunos autores cuestionan el valor vacunal de los antígenos salivales expuestos, ya que, a lo largo de la coevolución con el hospedador, la garrapata puede haber desarrollado vías para protegerlos de la respuesta inmunitaria (Brake and Pérez de León, 2012). Teniendo esto en cuenta, los antígenos salivales “silentes” serían candidatos vacunales más prometedores. Dichos antígenos son inoculados al hospedador con la saliva sin ser reconocidos por la respuesta inmunitaria frente a la picadura, pero sí son reconocidos por la respuesta inducida frente a ellos cuando son administrados en forma de vacuna. Estos antígenos no han estado sometidos a la presión selectiva del sistema inmunitario del hospedador y la garrapata no habrá desarrollado mecanismos para protegerlos, por lo que, en teoría conservarán una alta inmunogenicidad y pueden servir para desarrollar vacunas de acción dual, en las cuales las propias picaduras actuarían después como dosis antigénicas de recuerdo (Trimnell et al., 2002).

2. Ejercer una función vital para la garrapata, de modo que su bloqueo con anticuerpos produzca la muerte del parásito o la inhibición de su reproducción.

3. Estar codificado por un gen único, o con un bajo número de copias, y que no pertenezca a una familia multigénica, para evitar que la pérdida de función inducida por la vacuna sea compensada por otros miembros de la familia con funciones redundantes.
4. Que posea epítomos conservados en varias especies de garrapatas, e incluso en otras especies de artrópodos hematófagos, lo que facilitaría la obtención de vacunas de amplio espectro para el control de vectores hematófagos.
5. Y finalmente, sería deseable que redujese las tasas de infección y transmisión de patógenos, es decir, la capacidad vectorial de la garrapata.

Ninguno de los candidatos antigénicos actualmente disponibles cumple todos esos criterios y los más eficaces reúnen sólo 2 o 3 de ellos, como, por ejemplo, la Bm86 y la subolesina (ver más adelante). Ambos son antígenos ocultos, están muy conservados en diferentes especies de garrapatas y ambos son capaces de reducir la capacidad del vector para transmitir patógenos (de la Fuente et al., 2011).

Teniendo en cuenta los requisitos anteriores, en la búsqueda de nuevos antígenos protectores para vacunas anti-garrapata algunos autores recomiendan priorizar la identificación de antígenos de membrana del intestino medio, del ovario y de las glándulas salivales. También sugieren combinar las propiedades de los antígenos expuestos y los antígenos ocultos, lo que permitiría el desarrollo de vacunas de acción dual, las cuales se consideran muy prometedoras (Guerrero et al., 2012; Richards et al., 2015).

De acuerdo con la prioridad mencionada, y como vía para identificar nuevos candidatos antigénicos, se han comenzado a obtener y analizar los transcriptomas y proteomas del intestino medio de las especies de ixódidos más relevantes para la salud humana y animal, y actualmente ya se han publicado los de *Dermacentor variabilis* (Anderson et al., 2008), *Rhipicephalus microplus* (Rachinsky et al., 2008; Kongsuwan et al. 2010; Heekin et al. 2013; Popara et al., 2013) e *Ixodes ricinus* (Schwarz et al., 2014; Kotsyfakis et al., 2015).

En argásidos, en cambio, aún no se ha obtenido el transcriptoma del intestino medio de ninguna especie, y sólo se conoce el proteoma intestinal de *O. erraticus* (Oleaga et al., 2015). Se dispone, no obstante, de los sialomas de 3 especies de argásidos (*Argas monolakensis*, *Ornithodoros coriaceus* y *Ornithodoros parkeri*) (Francischetti et al. 2009) y del proteoma de la saliva de *O. moubata* (Díaz-Martín et al., 2013a), los cuales pueden utilizarse en el análisis integrado de los datos “ómicos” como referencia para la búsqueda e identificación de antígenos protectores de acción dual.

6. Desarrollo de vacunas frente a argásidos.

Los trabajos en los que se aborda el desarrollo de una vacuna frente a argásidos han sido mucho más escasos que los efectuados en ixódidos y se han dirigido frente a unas pocas especies de los géneros *Ornithodoros* y *Argas* (ver tabla adjunta).

En relación con *Argas* sp., los estudios efectuados son el de Dusbábek et al. (1990) en *Argas polonicus* y los de Sayed et al. (2001, 2004) en *Argas persicus*. Por su parte, los estudios con *Ornithodoros* incluyen los de Chinzei y Minoura (1988) y Salat et al. (2010) con *O. moubata*, Need y Butler (1991) con *Ornithodoros turicata* y *Ornithodoros talaje*, y los llevados a cabo por nuestro equipo de investigación con *O. erraticus* y *O. moubata*. En los citados trabajos se ha evaluado el valor vacunal tanto de antígenos salivales como de antígenos ocultos procedentes de diferentes órganos y tejidos.

Tabla 1. 1. Pruebas de vacuna frente a argásidos utilizando antígenos ocultos y salivales.

Especie	Antígeno	Identidad	Efecto protector	Ref. ^b
Antígenos ocultos				
<i>Argas polonicus</i>	Extracto de larvas	-	No	1
<i>Argas persicus</i>	DNA de huevos	-	No	2
<i>O. erraticus</i>	Hemolinfa	-	No	3
	Singanglio	-	No	
	Glándulas coxales	-	No	
	Tubo digestivo	-	No	
	Membranas intestinales	-	Reducción de la supervivencia de las ninfas (80%) y de la fecundidad de las hembras (50%)	4
	Oe45	Proteína intestinal de 45 kDas	Reducción de la supervivencia de las ninfas (25%) y de la fecundidad de las hembras (35-42%)	5
	rOeSub	Subolesina recombinante <i>O. erraticus</i>	Reducción de la oviposición (22%)	6
	rOmSub	Subolesina recombinante de <i>O. moubata</i>	Reducción de la oviposición (24,3%)	6
	OE1	Péptido de la secuencia de OeSub (32-47 aa)	Reducción de la oviposición (49%)	7
	OE2	Péptido de la secuencia de OeSub (96-111 aa)	Reducción de la fertilidad (82%)	
	OM1	Péptido de la secuencia de OmSub (14-27 aa)	Reducción de la fertilidad (50%)	
	OM2	Péptido de la secuencia de OmSub (90-105 aa)	Reducción de la fertilidad (17%)	

Introducción

<i>O. moubata</i>	Proteína del huevo	Vitellina	Reducción de la oviposición (50%)	8
	Membranas intestinales	-	Reducción de la alimentación y la reproducción (40%)	9
	rOeSub,	Subolesina recombinante de <i>O. erraticus</i>	Reducción de la oviposición (8,5%)	6
<i>O. moubata</i>	rOmSub	Subolesina recombinante de <i>O. moubata</i>	Reducción de la oviposición (5,2%)	6
	Proteína del huevo	Vitellina	Reducción de la oviposición (50%)	8
	Membranas intestinales	-	Reducción de la alimentación y la reproducción (40%)	9
	rOeSub,	Subolesina recombinante de <i>O. erraticus</i>	Reducción de la oviposición (8,5%)	6
	rOmSub	Subolesina recombinante de <i>O. moubata</i>	Reducción de la oviposición (5,2%)	6
<i>O. moubata</i>	OE1	Péptido de la secuencia de OeSub (32-47 aa)	Reducción de la fertilidad (35%)	7
	OE2	Péptido de la secuencia de OeSub (96-111 aa)	Reducción de la fertilidad (40%)	
	OM1	Péptido de la secuencia de OmSub (14-27 aa)	Reducción de la fertilidad (45%)	
	OM2	Péptido de la secuencia de OmSub (90-105 aa)	Reducción de la fertilidad (60%)	
<i>O. talaje</i>	Tubo digestivo	-	Reducción de la supervivencia (32%)	10
<i>O. talaje</i>	Extracto de órganos internos	-	Reducción de la supervivencia (27%)	
<i>O. turicata</i>	Tubo digestivo	-	No	
<i>O. turicata</i>	Extracto de órganos internos	-	No	
Antígenos salivales				
<i>Argas polonicus</i>	Extracto de glándulas salivales (SGE)	-	No	11
<i>Argas persicus</i>	SGE	-	Reducción de la alimentación (58-62%)	12
<i>Argas persicus</i>	SGE	-	Reducción de la alimentación (58-62%)	12
<i>O. erraticus</i>	SGE	-	Protección baja y variable	3
	Antígeno de 70 kDa	-	No	
	Antígeno de 50 kDa	-	No	
	Antígeno de 20 kDa	-	Reducción de la alimentación y la fertilidad (50%)	
<i>O. moubata</i>	SGE	-	Reducción de la alimentación y la fertilidad (60-70%)	3
	Om44	-	Reducción de la alimentación (54%) y la fertilidad (50%)	14

<i>O. moubata</i>	OmC2	Cistatina	Reducción de la alimentación (39%) y aumento de la mortalidad (15%) de ninfas-1.	15
	rOmENO	Enolasa	Reducción de la fertilidad (18%) y aumento de la mortalidad (20%) de ninfas.	16
	rOmPLA2	Fosfolipasa A ₂ recombinante	Reducción de la fertilidad (23%) y aumento de la mortalidad (11-32%)(E=44,2%) ^a	17
<i>O. moubata</i>	rOmAPY	Apirasa recombinante	Reducción de la fertilidad (26%) y aumento de la mortalidad (16%) (E=27,2%) ^a	17
	rOmMOU	Mougrina recombinante	Reducción de la fertilidad (32%) (E=43,2%) ^a	
	rOmPLA2+ rOmAPY+ rOmMOU	Vacuna combinada de tres proteínas recombinantes	Reducción de la fertilidad (35-50%)(E=50-58%) ^a	
<i>O. talaje</i>	SGE	-	Reducción de la supervivencia de larvas (19%).	10

^a Eficacia vacunal, $E = 100 (1 - S \times F)$, donde S y F representan, respectivamente, la reducción en la supervivencia y fertilidad de las garrapatas alimentadas en los animales vacunados respecto de las alimentados en los animales control (tratados únicamente con el adyuvante).

^b Ref.: 1, Dusbábek et al. (1990); 2, Sayed et al. (2004); 3, Astigarraga et al. (1995); 4, Manzano-Román et al. (2006); 5, Manzano-Román et al. (2007); 6, Manzano-Román et al. (2012b); 7, Manzano-Román et al. (2015); 8, Chinzei and Minoura (1988); 9, García-Varas, 2004; 10, Need and Butler (1991); 11, Dusbábek et al. (1990); 12, Sayed et al. (2004); 13, Manzano-Román (2002); 14, García-Varas et al. (2010); 15, Salat et al. (2010); 16, Díaz-Martín et al. (2013b); 17, Díaz-Martín et al. (2015).

6.1. Ensayos con antígenos salivales.

Los ensayos con antígenos salivales de argásidos han mostrado unos resultados bastante variables en cuanto a la protección conseguida. El primero de estos ensayos fue el de Need y Butler (1991), en el cual observaron un 16 % de mortalidad en las larvas de *O. talaje* alimentadas sobre ratones CD1 vacunados con un extracto completo de las glándulas salivales; mortalidad de similar magnitud a la inducida por la respuesta natural.

Más recientemente, Salat et al. (2010) evaluaron la capacidad protectora de la cistatina OmC2 de *O. moubata* en ratones C3H/HeN, observando un 15 % de mortalidad y un 39 % de reducción en las tasas de alimentación y muda de las ninfas-1 alimentadas sobre los animales vacunados, que fue la única fase evolutiva analizada en este trabajo.

En cuanto a los ensayos con antígenos salivales llevados a cabo por nosotros, éstos también fueron iniciados por Astigarraga et al. (1995) vacunando cerdos con SGE de *O. erraticus* y de *O. moubata*.

Frente a *O. erraticus* se obtuvo una respuesta protectora muy variable, que en el mejor de los casos llegó a inhibir hasta el 50 % la alimentación y la fecundidad de las hembras. Aunque dicha variabilidad restaba interés al SGE de *O. erraticus* como antígeno vacunal, los resultados demostraron que, en esta especie, era posible inducir respuestas

protectoras con antígenos salivales. La protección lograda en estas pruebas se atribuyó al reconocimiento, forzado por los adyuvantes de Freund, de varios antígenos silentes del SGE: en concreto, tres proteínas de 70, 50 y 20 kDa (Astigarraga et al., 1995). Posteriormente, para identificar qué antígenos eran capaces de inducir una respuesta protectora uniforme, Manzano Román (2002) purificó estos 3 antígenos silentes y los administró individualmente a nuevos cerdos. En estos ensayos se comprobó: (i) que todos los animales vacunados con los antígenos de 70 y 50 kDa desarrollaban respuestas humorales que reconocían específicamente al antígeno, pero que dicho reconocimiento no proporcionaba protección y (ii) que el reconocimiento del componente de 20 kDa inhibía en más de un 50 % la alimentación de los parásitos, pero que la mayoría de los cerdos vacunados eran incapaces de reconocerlo, con independencia de la dosis, adyuvante y modo de administración. Teniendo en cuenta estos resultados, se concluyó que, frente a *O. erraticus*, la mera inducción del reconocimiento de componentes salivales silentes (como los de 70 y 50 kDa) no es sinónimo de protección y que, en cambio, sí podría serlo el reconocimiento de antígenos silentes concretos, como el de 20 kDa, los cuales están mucho más protegidos por el parásito, en vista de la dificultad para inducir una respuesta frente a ellos en todos los animales vacunados. Las desventajas y limitaciones de estos tres antígenos les restaron interés como candidatos vacunales, motivo por el cual no se continuó su identificación y caracterización, de modo que sus secuencias y funciones, así como la forma en que el antígeno de 20 kDa evade su reconocimiento por el sistema inmunológico, siguen siendo desconocidos (Manzano Román, 2002).

En cuanto a *O. moubata*, la vacunación de cerdos con SGE indujo una respuesta protectora uniforme en todos los animales vacunados, que redujo la alimentación y oviposición de las hembras entre el 60 % y 70 %. Además, todos los animales vacunados reconocieron una proteína de 44 kDa (Om44), que no era reconocida por la respuesta inmunitaria del hospedador a los contactos naturales (Astigarraga et al., 1995). Estudios posteriores revelaron que el antígeno Om44, purificado y administrado individualmente a cerdos y conejos, inducía respuestas protectoras que inhibían la alimentación de las garrapatas hasta un 54 % y que la protección aumentaba tras sucesivos contactos con *O. moubata*, indicando que Om44 es un antígeno salival silente de acción dual (García-Varas, 2004).

La caracterización funcional de Om44 mostró que era un ligando antagonista de la P-selectina del hospedador (García-Varas et al., 2010). Tras una lesión vascular, como la picadura de una garrapata, las células endoteliales y las plaquetas activas comienzan a expresar P-selectina, la cual se une entonces a su ligando en los leucocitos (la molécula PSGL-1) potenciando localmente la respuesta hemostática e inflamatoria a dicha lesión (Cleator et al., 2006). Esta respuesta puede impedir la alimentación de las garrapatas, por lo que la inhibición de la interacción entre la P-selectina y el PSGL-1 resulta esencial para que *O. moubata* pueda completar la toma de sangre. Pues bien, García-Varas et al. (2010) comprobaron: (i) que Om44 se une a la P-selectina, bloqueando la hemostasia y permitiendo la alimentación de la garrapata, y (ii) que dicha unión es inhibida por los anticuerpos anti-Om44 inducidos por la vacuna, restaurando la hemostasia y bloqueando la alimentación del parásito. Los datos anteriores representaban la primera evidencia de un nuevo mecanismo

antihemostático en vectores hematófagos y por tanto asignaban un gran interés a la Om44 como antígeno vacunal.

Los subsiguientes intentos de identificación de Om44 mediante espectrometría de masas mostraron que Om44 no es un ortólogo de ningún ligando conocido de P-selectina, como el PSLG-1 ni la pentraxina 3, aunque el resultado de alguno de estos análisis sugería que Om44 podría ser una isoforma de enolasa (García-Varas et al., 2010; Pérez-Sánchez et al., 2010). Dado que en la saliva de *O. moubata* se habían encontrado cantidades significativas de enolasa, se clonó y se analizó funcionalmente esta proteína (Díaz-Martín et al., 2013a, 2013b). El análisis mostró que esta enolasa salival secretada no era un ligando de P-selectina y que, por el contrario, actuaba como receptor profibrinolítico de plasminógeno del hospedador, potenciando la generación de plasmina. Debido a esta actividad en la interfase garrapata-hospedador, se evaluó la eficacia vacunal de la enolasa recombinante en conejos, observándose una reducción en torno al 20% en la oviposición de las hembras y en la supervivencia de las ninfas; un efecto que difería cuantitativa y cualitativamente del efecto protector inducido por Om44, confirmando que la enolasa no era la identidad de Om44 (Díaz-Martín et al. 2013b).

La identificación de Om44 se abordó entonces mediante la construcción de microarrays de proteínas a partir de una genoteca ADNc de glándulas salivales de *O. moubata* y el sondeo de dichos microarrays con P-selectina y suero hiperinmune frente a Om44. Estos experimentos mostraron que Om44 era una forma secretada de fosfolipasa A₂ (GenBank KC908103.1) capaz de unirse a P-selectina mediante interacciones proteína-proteína sin la participación de grupos glicánicos (Díaz-Martín, 2014; Manzano-Román et al., 2012c).

Además, la secuenciación al azar de la genoteca ADNc permitió identificar otras dos proteínas salivales antihemostáticas de *O. moubata*, concretamente una apirasa (GenBank KC908110.1) y una disagregina ortóloga a la savignygrina de *O. savignyi*, a la cual denominamos mougrina (GenBank KC908105.1).

La vacunación de conejos con las formas recombinantes de estas tres proteínas salivales (administradas individual y conjuntamente) proporcionó respuestas protectoras que redujeron la alimentación y fertilidad de las hembras y la supervivencia de las ninfas (Díaz-Martín et al., 2015). La eficacia protectora individual de cada antígeno varió entre el 27% y el 44 % y la eficacia conjunta alcanzó el 50 % en una primera infestación y superó el 60 % en infestaciones secundarias. Por último, se identificaron varios epítomos B-lineales inmunodominantes en cada antígeno, que pudieron ser los responsables de la protección observada.

En conjunto, estos resultados confirman que, en argásidos, los antígenos salivales silentes con funciones antihemostáticas son candidatos vacunales muy prometedores por los siguientes motivos: (i) estos antígenos inducen respuestas protectoras que bloquean parcialmente la ingestión de sangre como consecuencia de la neutralización de la función antihemostática por los anticuerpos; (ii) el uso combinado de varios de estos antihemostáticos

redundantes como antígenos eleva la eficacia protectora al evitar que la redundancia funcional de los componentes salivales de las garrapatas compense la pérdida de función de cada antígeno vacunal individual (Chmelar et al., 2012; Kazimírová and Štibrániová, 2013) y (iii) el efecto protector es potenciado por los contactos naturales posteriores a la vacuna, lo que en principio, haría innecesarias las revacunaciones.

Además, la identificación de los epítomos protectores en esos antígenos proporciona la base para identificar epítomos protectores conservados en ortólogos funcionales de otras especies de argásidos e incluso ixódidos. Dichos epítomos se podrían incluir en el diseño de antígenos recombinantes quiméricos para obtener vacunas de amplio espectro para el control de un mayor número de vectores y por extensión los patógenos que transmiten (Prudencio et al., 2010; de la Fuente, 2012; Parizi et al., 2012; Merino et al., 2013).

6.2. Ensayos con antígenos ocultos.

El primero de estos trabajos fue el de Chinzei y Minoura (1988), quienes vacunaron conejos con el vitelo de huevos de *O. moubata* y obtuvieron una respuesta que disminuyó la fecundidad de las hembras en un 50 %. Dado que los anticuerpos del hospedador acceden intactos desde el lumen intestinal a la hemolinfa (Minoura et al., 1985; Chinzei y Minoura, 1988; Ben-Yakir, 1989), unos anticuerpos anti-vitelina/vitelogenina podrían haber inhibido la incorporación de la vitelogenina, desde el intestino y la hemolinfa, a los oocitos en forma de vitelina, lo cual podría explicar el efecto protector (Kopacek et al., 2000; Gudderra et al., 2002; Horigane et al., 2010).

Poco después, Need y Butler (1991) inmunizaron ratones CD1 frente a *O. turicata* y *O. talaje* con extractos de tubo digestivo y del conjunto de los órganos internos distintos del tubo digestivo. Ninguno de los dos extractos proporcionó protección frente a las larvas de *O. turicata*, pero sí frente a las de *O. talaje*, que son de alimentación lenta, entre las cuales provocaron un incremento de la mortalidad del 12% al 29 %, similar al inducido por la respuesta natural frente a esta especie. Dado que en las larvas de ambas especies se detectaron anticuerpos del hospedador, los autores atribuyeron el efecto protector frente a *O. talaje* a la respuesta celular. Aunque dicha observación es correcta, no se puede descartar el papel de los anticuerpos en el efecto protector. La protección pudo estar relacionada con una mayor exposición de las larvas de *O. talaje* a los anticuerpos del hospedador debido a la mayor duración de su alimentación, con una mayor calidad (afinidad y avidéz) de los anticuerpos anti-*O. talaje* (Vidarsson et al., 2014) y con el reconocimiento de epítomos particulares (protectores frente a no protectores) en cada preparación antigénica (Manzano-Román et al., 2015).

Nuestro grupo comenzó los estudios con antígenos ocultos de argásidos vacunando cerdos con extractos solubles de la hemolinfa, singanglio, glándulas coxales y tubo digestivo de *O. erraticus* (Astigarraga et al., 1995). Con estos antígenos no se consiguió protección alguna, probablemente porque durante la preparación de los extractos antigénicos se eliminaron las proteínas de membrana de tales extractos. Y de acuerdo con los criterios

comentados en el apartado anterior, esas proteínas, y en particular las que exponen los enterocitos por su cara luminal, podrían ser las de mayor interés vacunal.

La verificación de la hipótesis anterior fue uno de los objetivos de la tesis doctoral de Manzano Román (2002), en la cual se demostró: (i) que, efectivamente, un extracto de las proteínas de membrana de los enterocitos de *O. erraticus* inducía en cerdos, conejos y ratones una respuesta protectora capaz de provocar descensos en las tasas de alimentación y fecundidad de las hembras de hasta el 50 % y, además, la muerte de hasta el 80 % de las ninfas en las primeras 72 horas post-alimentación; (ii) que la molécula responsable de la protección era una proteína de 45 kDa (denominada Oe45) que se expresa en la membrana luminal de los enterocitos entre las 24 y 72 horas post-alimentación y (iii) que la protección está mediada por el sistema del complemento, el cual se fija sobre la superficie de los enterocitos a través de los anticuerpos anti-Oe45 provocando la lisis celular y la subsiguiente destrucción del intestino, de forma similar a lo observado en las vacunas basadas en el antígeno Bm86 (Manzano-Román et al., 2006, 2007). Actualmente aún desconocemos la identidad de este antígeno Oe45.

En vista de la alta protección conseguida frente a *O. erraticus* con las proteínas de membrana de sus enterocitos, se llevaron a cabo ensayos análogos frente a *O. moubata* vacunando cerdos con el extracto homólogo del tubo digestivo de esta especie (García Varas, 2004). La protección conseguida frente a *O. moubata* fue menor y consistió en un 40 % de reducción de las tasas de alimentación y de fertilidad de las hembras, sin provocar la muerte prematura de los parásitos. El hecho de que esta respuesta no matase a los ejemplares se atribuyó a que *O. moubata* elimina el fluido coxal durante el proceso de alimentación, a diferencia de *O. erraticus* que lo hace en las 24 horas siguientes. Consecuentemente, en *O. moubata* la sangre puede llegar al intestino medio lo suficientemente concentrada como para impedir que los anticuerpos y las proteínas del complemento difundan hacia la cara luminal de los enterocitos y alcancen a sus dianas (García Varas, 2004).

Por último, en un trabajo más reciente se evaluó el potencial protector de los ortólogos de subolesina de *O. erraticus* y *O. moubata*. La subolesina fue descubierta como antígeno protector en la especie americana *Ixodes scapularis* (Almazán et al., 2003). Posteriormente se demostró que la subolesina es un ortólogo de las akirinas de insectos y vertebrados y que, como ellas, actúa como factor de transcripción regulando la expresión génica en múltiples procesos fisiológicos de las garrapatas incluyendo la digestión, el desarrollo y la reproducción (Goto et al., 2008; Galindo et al., 2009). También se observó que interviene en la respuesta inmunitaria innata de la garrapata y en la infección por patógenos como *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Borrelia burgdorferi* (de la Fuente et al., 2013). La vacunación con subolesina, o con sus epítomos protectores conservados, protege frente a las infestaciones por ixódidos, mosquitos y flebotomos y reduce las tasas de transmisión de patógenos (Merino et al., 2011; Moreno-Cid et al., 2013), por lo que se considera un buen candidato para el desarrollo de vacunas de amplio espectro para el control de los vectores hematófagos y de los patógenos que transmiten (de la Fuente et al., 2011, 2013).

En consecuencia, se examinó el valor vacunal de la subolesina en los ornithodoros observándose que su silenciamiento génico por RNAi en *O. erraticus* y *O. moubata* no afectaba a las tasas de alimentación ni supervivencia, pero inhibía la oviposición en más de un 88 %. Por su parte, la vacunación de conejos con las formas recombinantes de ambas subolesinas indujo robustas respuestas humorales, que, sin embargo, sólo redujeron la oviposición entre el 5% y el 24,5%, sin afectar a ningún otro de los parámetros examinados (Manzano-Román et al., 2012b).

Tratando de explicar la baja eficacia vacunal observada, en un trabajo posterior se comprobó que la inmunización con las proteínas recombinantes enteras inducía la síntesis de anticuerpos frente a los epítomos B lineales inmunodominantes, que están localizados en regiones altamente estructuradas de la proteína. Con toda probabilidad, estas regiones no intervienen en la actividad biológica de la subolesina, mientras que las regiones más desordenadas, las que supuestamente contienen el sitio activo, no fueron reconocidas por los anticuerpos inducidos por la vacuna, lo que explicaría la escasa protección conseguida. Para forzar el reconocimiento de las regiones desestructuradas, se diseñaron y sintetizaron varios péptidos a partir de las secuencias de dichas regiones y, tras conjugarlos con hemocianina (KLH), se usaron para vacunar conejos. La vacunación con estos conjugados generó anticuerpos específicos frente a las regiones no estructuradas de ambas subolesinas y proporcionó hasta un 70,1% y 83,1% de protección frente a *O. erraticus* y *O. moubata* respectivamente (Manzano-Román et al., 2015).

Estos resultados indicaban que el efecto protector de las vacunas basadas en subolesina depende de los epítomos concretos que son reconocidos por los anticuerpos y sugieren que la actividad biológica de estas proteínas es asumida por sus regiones no estructuradas, en paralelo con lo observado por otros autores (de la Fuente et al., 2013; Merino et al., 2013; Moreno-Cid et al., 2013). Adicionalmente, estos resultados suministraron 4 péptidos protectores al acervo de candidatos antigénicos para el desarrollo de vacunas anti-garrapata y permiten incluir a los argásidos en el conjunto de vectores hematófagos sensibles a las vacunas basadas en subolesina/akirina.

7. Nuevas estrategias para la identificación de antígenos protectores.

7.1. Introducción a la vacunología reversa.

En su revisión sobre las vacunas anti-garrapata, Willadsen (2008) analiza los tres principales tipos de abordajes experimentales tradicionalmente utilizados para identificar antígenos protectores en las garrapatas: el inmunológico, basado en el estudio de antígenos que provocan una respuesta inmune; el funcional, basado en la identificación de proteínas de la garrapata importantes para la fisiología y la supervivencia del parásito; y, por último, el fraccionamiento bioquímico, basado en la vacunación con fracciones de extractos proteicos de composición progresivamente más simple y análisis del efecto sobre el parásito hasta aislar un antígeno protector individual.

Actualmente, el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías de análisis masivo a las garrapatas (NGS, RNA-seq, etc.) está incrementando la aún escasa disponibilidad de datos “ómicos” de garrapatas (genómicos, transcriptómicos, proteómicos, metabolómicos, etc.) en las bases de datos de acceso público (como por ejemplo, VectorBase, The Gene Index Project, CattleTickBase).

Esta creciente disponibilidad de secuencias de garrapata junto con el desarrollo en paralelo de herramientas bioinformáticas más potentes y específicas para la integración y análisis de datos “ómicos” están permitiendo la rápida transición desde las aproximaciones tradicionales para la búsqueda de antígenos protectores de garrapata hacia las nuevas estrategias de vacunología reversa. Prueba de ello son los abundantes artículos experimentales (y de revisión) que se han publicado recientemente sobre este tema, de los cuales citamos los más representativos: Aljamali et al. (2009a, 2009b), Flower et al. (2010), Ribeiro et al. (2011, 2012), Guerrero et al. (2012), Maritz-Olivier et al. (2012), Oliveira et al. (2013), de la Fuente y Merino (2013), Lew-Tabor et al. (2014), de la Fuente y Contreras (2015), Richards et al. (2015), Chmelar et al. (2016), de la Fuente et al. (2016), Lew-Tabor y Rodríguez Valle (2016).

La vacunología reversa parte de enfoques holísticos, basados en la biología de sistemas, en los que se analizan las interacciones entre los hospedadores, las garrapatas y los patógenos, obteniendo información genómica, transcriptómica, proteómica, inmunológica y metabólica, que posteriormente se integra y analiza *in silico* con diferentes herramientas bioinformáticas (Cuadro 1. 1).

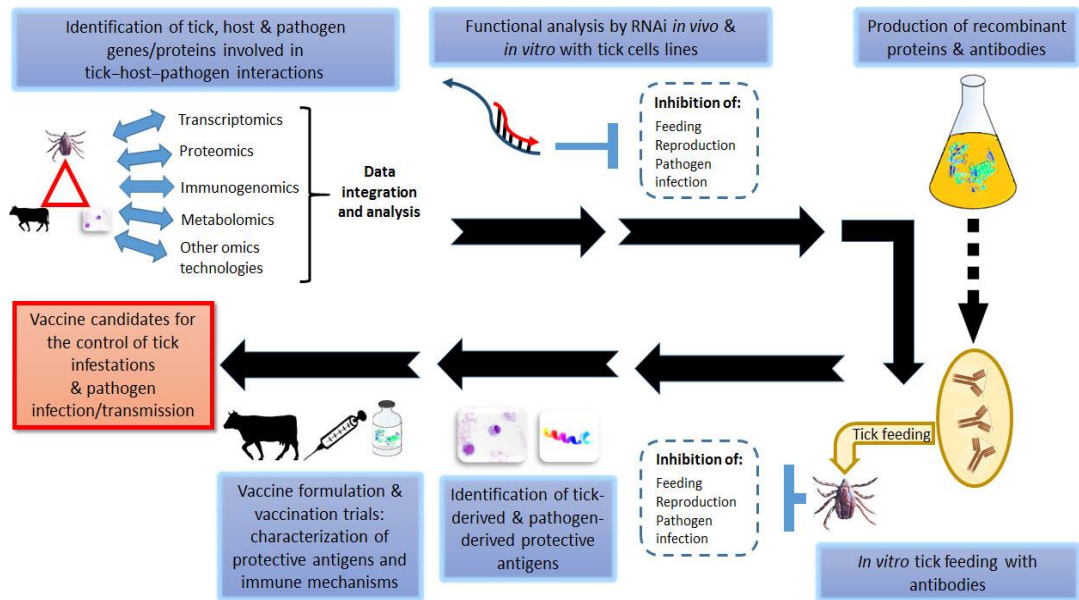
El análisis bioinformático permite realizar una selección teórica de candidatos vacunales en función de determinados criterios basados en hipótesis, como por ejemplo, la localización subcelular, la expresión en membranas, su inmunogenicidad o su posible función biológica (Nakaya et al., 2012, Six et al., 2012).

La lista de candidatos resultantes puede entonces reducirse en función de criterios adicionales como su expresión en distintas especies, fases evolutivas y tejidos, o su expresión transitoria en función del estado fisiológico de los ejemplares. En este punto, la obtención de los correspondientes proteomas y la integración de los datos proteómicos son de gran utilidad (Anderson et al., 2008).

Si el número de candidatos resultantes aún es elevado, éstos pueden someterse a ensayos experimentales con el fin de seleccionar aquellos con el mayor potencial protector, como, por ejemplo, el silenciamiento génico mediante ARN interferente (RNAi) (de la Fuente et al., 2010) o la alimentación *in vitro* con anticuerpos frente a esos antígeno (Lew-Tabor et al., 2014).

Los candidatos finalmente elegidos son obtenidos en forma recombinante y validados en pruebas de vacunación de animales en condiciones de laboratorio y de campo. Por último, se debe caracterizar la función biológica del antígeno y el mecanismo inmunológico responsable del efecto protector.

Con toda esa información sería posible diseñar vacunas más eficaces mediante la combinación de varios antígenos con funciones distintas para producir un efecto protector sinérgico (de la Fuente y Merino, 2013; de la Fuente et al., 2016).



Cuadro 1. 1. Vacunología reversa aplicada al desarrollo de vacunas para el control de las infestaciones por garrapatas y de la transmisión de patógenos. La figura presenta un enfoque holístico (biología de sistemas) basado en la integración y análisis de datos ómicos obtenidos a partir del examen de las interacciones hospedador-garrapata-patógeno (de la Fuente et al., 2016).

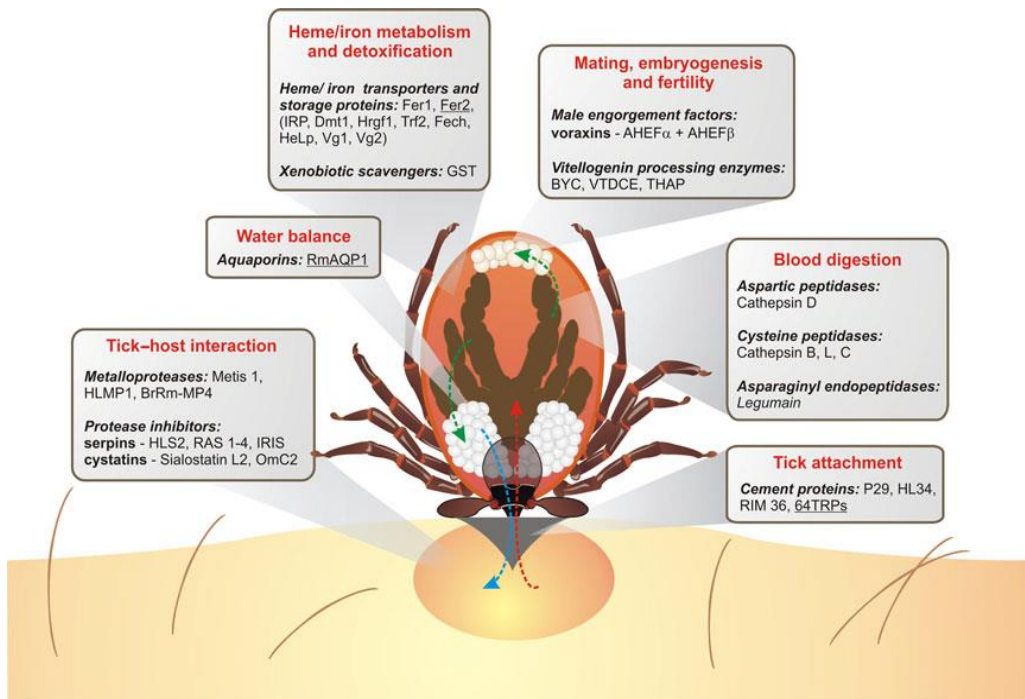
7.2. Vacunología reversa aplicada al desarrollo de vacunas frente a argásidos.

Como acabamos de señalar, la vacunología reversa es el nuevo paradigma para el descubrimiento de vacunas frente a garrapatas (Lew-Tabor y Rodríguez Valle, 2016). En las revisiones recientes sobre este tema se recopilan las diversas estrategias aplicadas al desarrollo de vacunas frente a garrapatas y frente a los patógenos que éstas transmiten, al tiempo que se proporciona un amplio listado de herramientas bioinformáticas y bases de datos de utilidad para la selección *in silico* de candidatos vacunales (Lew-Tabor y Rodríguez Valle, 2016).

En otra revisión reciente se analiza un conjunto de procesos fisiológicos y moléculas vitales, desarrollados por las garrapatas como consecuencia de su adaptación a la hematofagia estricta, los cuales son razonadamente propuestos como dianas antigénicas para el diseño de nuevas aproximaciones de vacunología reversa. Dichos procesos son la fijación al hospedador e ingestión de la sangre -incluyendo la neutralización de las respuestas defensivas del hospedador-, el balance hídrico, la digestión de la sangre y la absorción de los nutrientes, el

metabolismo del grupo hemo y el hierro dietarios, la detoxificación y, finalmente, el apareamiento y reproducción incluyendo la vitelogénesis, embriogénesis y fertilidad (de la Fuente et al., 2016).

En esta revisión también se compendian y comentan los principales candidatos antigénicos ya identificados asociados con dichos procesos (Cuadro 1.2).



Cuadro 1. 2. Principales procesos fisiológicos resultantes de la adaptación a la hematofagia de las garrapatas. Para cada uno de ellos se indican algunas de las moléculas implicadas que han sido ensayadas como candidatos vacunales. Los candidatos más prometedores están subrayados (de la Fuente et al., 2016).

Los mencionados procesos tienen lugar en células de las glándulas salivales, el intestino y el ovario, por lo que, de acuerdo con lo sugerido en el apartado 5, dichos órganos constituyen objetivos prioritarios para la búsqueda de nuevos antígenos protectores, tanto en ixódidos como en argásidos.

En todas estas revisiones también se destaca la actual escasez de datos genómicos de garrapatas, la cual tiene entre sus causas el gran tamaño de los genomas de estos organismos y la alta proporción en ellos de densas regiones repetitivas. En la actualidad sólo están disponibles el genoma completo de *Ixodes scapularis* y partes de los genomas de *I. ricinus* y *R. microplus*; no se dispone de genomas de argásidos.

Debido a la complejidad de los genomas de garrapata, la mayor parte de las aproximaciones de vacunología reversa desarrolladas con estos organismos han optado por obtener primero los transcriptomas y proteomas de los órganos de interés, esencialmente las glándulas salivales (sialomas) y el intestino medio (mialomas), y posteriormente identificar los genes/proteínas expresados diferencialmente por las garrapatas durante la alimentación y la digestión de la sangre (de la Fuente et al., 2016).

La práctica totalidad de estas aproximaciones se han llevado a cabo en ixódidos y sólo ahora están comenzando a abordarse en argásidos. De hecho, en argásidos, hasta la fecha sólo se han publicado los sialomas de *Argas monolakensis*, *Ornithodoros coriaceus* y *Ornithodoros parkeri* (Francischetti et al. 2009) y el proteoma salival de *O. moubata* (Díaz-Martín et al., 2013a). Un análisis comparado de los sialomas de ixódidos y argásidos disponibles demostró que las principales familias de proteínas salivales se conservan en ambas familias de garrapatas (Mans et al., 2008). Por tanto, la obtención de los sialomas de otras especies de argásidos posibilitaría la búsqueda de antígenos salivales protectores conservados y, por otra parte, el análisis integrado de sus sialomas y mialomas facilitaría la identificación de antígenos protectores para el desarrollo de vacunas de acción dual.

Como se señaló en el apartado 5, varios programas de investigación actualmente en curso están dando prioridad a la identificación de antígenos protectores que se expresan en las membranas del intestino medio de los ixódidos (Guerrero et al., 2012; Richards et al., 2015). Esto debería ser también una prioridad para los argásidos, pero la carencia de mialomas de argásidos impide, por ahora, la identificación de antígenos intestinales potencialmente protectores mediante la aplicación de estrategias de vacunología reversa.

De hecho, como ya se ha señalado, aún no se dispone de datos transcriptómicos del intestino medio de ningún argásido y sólo se dispone del proteoma del intestino medio de *O. erraticus* (Oleaga et al., 2015).

Por tanto, la obtención y análisis de los transcriptomas y proteomas del intestino medio de los principales argásidos vectores de enfermedades es una necesidad urgente.

Esta información proporcionará conocimientos básicos sobre la biología de estos parásitos y su relación con los hospedantes y los patógenos que transmiten. También permitirá comparar su composición con la de los mialomas de los ixódidos y, probablemente, la identificación de antígenos conservados en ambas familias, permitiendo la selección de antígenos diana.

Hipótesis y Objetivos

La garrapata *Ornithodoros moubata* es un argásido africano distribuido por los países del este, centro y sur del continente (Vial, 2009; Quembo et al., 2016), donde transmite la Fiebre recurrente humana causada por *Borrelia duttoni* y la Peste porcina africana (PPA).

La presencia de *O. moubata* en el entorno doméstico y peridoméstico contribuye a la persistencia de ambas enfermedades en las zonas endémicas y, además, representa un constante riesgo de propagación de dichas enfermedades hacia otras regiones (Cutler, 2010; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; Quembo et al., 2016).

La prevención y control de dichas enfermedades requiere la eliminación de las poblaciones sinantrópicas de *O. moubata*. La aplicación de acaricidas como método de lucha frente a este argásido resulta ineficaz y, por tanto, se necesitan métodos alternativos de control, como podrían ser las vacunas anti-garrapata. Con ese objetivo, nuestro grupo inició el desarrollo de una vacuna anti-*O. moubata* evaluando la capacidad protectora de dos tipos de antígenos: salivales e intestinales.

Los estudios con antígenos salivales nos permitieron identificar tres componentes antihemostáticos protectores que, administrados conjuntamente, proporcionan más de un 50% de eficacia protectora, lo cual los convierte en interesantes candidatos vacunales. Pero, pese a ello, aún no se ha podido obtener una vacuna que sea completamente eficaz frente a *O. moubata* y que esté basada únicamente en antígenos salivales (Díaz-Martín et al., 2015).

Por su parte, la posibilidad de obtener respuestas protectoras más eficaces utilizando antígenos intestinales de *O. moubata* parecía más probable al ser este tipo de antígenos los utilizados en las dos únicas vacunas anti-garrapata eficaces comercializadas hasta la fecha, TickGARD® y GAVAC®.

En nuestros estudios previos con *O. moubata* y con la especie ibérica *Ornithodoros erraticus*, la inmunización de animales con extractos de membrana del intestino indujo respuestas protectoras que redujeron significativamente la alimentación y fecundidad de las hembras (García Varas, 2004; Manzano-Román et al., 2006). En esos mismos estudios se comprobó que los antígenos responsables del efecto protector eran proteínas de la membrana luminal de los enterocitos y que su expresión aumentaba significativamente tras la ingestión de la sangre, alcanzando un máximo en torno a las 48 horas post-alimentación (Manzano-Román et al., 2007).

Estas proteínas aún no han sido identificadas, pero los resultados anteriores confirman la capacidad protectora de los antígenos de membrana del intestino de ambas especies, convirtiendo al intestino medio de los ornithodoros en objetivo prioritario de estudio en la búsqueda e identificación de candidatos vacunales.

El intestino medio de las garrapatas es el órgano encargado de digerir la sangre del hospedador y de absorber los nutrientes imprescindibles para su supervivencia y reproducción (Sojka et al., 2013). Además constituye la primera barrera defensiva a la que se enfrentan los

microorganismos patógenos ingeridos con la sangre, la cual debe ser eficientemente superada por éstos para invadir y multiplicarse en otros órganos y, desde ellos, transmitirse a la siguiente fase evolutiva, a la descendencia y a otros hospedadores (Kocan et al., 2004).

En definitiva, el intestino medio forma parte de la interfase hospedador-garrapata-patógeno y en él se expresan numerosas proteínas que intervienen en procesos fisiológicos vitales para la garrapata y/o en los mecanismos de invasión, multiplicación y transmisión de patógenos. Por tanto, dichas proteínas son de gran interés como candidatos antigénicos para el desarrollo de vacunas anti-garrapata y vacunas bloqueantes de la transmisión de enfermedades.

Cabe esperar que ese conjunto de proteínas intestinales experimenten una expresión diferencial en respuesta al estímulo proporcionado por la fijación al hospedador y la ingestión de la sangre. Y de acuerdo con nuestras observaciones previas (Manzano-Román et al., 2007) y lo descrito por otros autores (Akov, 1982; Sojka et al., 2013), cabría esperar que las proteínas sobre-expresadas en torno a las 48 horas post-alimentación muestren un alto potencial protector.

Estas proteínas, al ser antígenos ocultos no habrán sufrido la presión selectiva de la respuesta inmunitaria del hospedador, por lo que: (i) mantendrán una alta inmunogenicidad y es previsible que induzcan fuertes repuestas humorales si se administran artificialmente con adyuvantes; y (ii) es probable que estén conservadas en otros argásidos, e incluso en ixódidos, lo que permitiría utilizarlas en una vacuna de amplio espectro frente a estos vectores hematófagos.

De dichas proteínas, las expresadas en la membrana plasmática luminal del enterocito (junto con las secretadas a la luz intestinal) son las más fácilmente accesibles a los efectores inmunes ingeridos con la sangre del hospedador (esencialmente, los anticuerpos y el complemento), por lo que serían las de primera elección como dianas vacunales.

A la vista de lo anterior, y dado que en *O. moubata* se desconoce casi por completo la composición proteica de su tubo digestivo, en la presente tesis doctoral nos propusimos los siguientes **OBJETIVOS GENERALES**:

- (i) La obtención del mialoma (transcriptoma + proteoma) del intestino medio de *O. moubata*.
- (ii) El análisis comparado de dicho mialoma antes y después de la alimentación para identificar genes/proteínas expresados diferencialmente en respuesta a la digestión de la sangre.
- (iii) La selección de antígenos potencialmente protectores entre las proteínas de membrana sobre-expresadas tras la alimentación aplicando una estrategia de vacunología reversa e incluyendo la validación experimental de los candidatos en pruebas de inmunización de animales.

La consecución de dichos objetivos generales se planteó a través de los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Obtención del transcriptoma del intestino de hembras de *O. moubata* en ayunas y a las 48 horas post-alimentación. Anotación y comparación entre los dos estados fisiológicos.
2. Obtención del proteoma del intestino de hembras de *O. moubata* en ayunas y a las 48 horas post-alimentación. Anotación y comparación entre ambos estados fisiológicos.
3. Selección *in silico* de antígenos potencialmente protectores a partir de la información transcriptómica y proteómica basada, esencialmente, en criterios de inmunogenicidad, localización celular y sobreexpresión tras la alimentación.
4. Producción de formas recombinantes de los antígenos seleccionados en el objetivo anterior o bien diseño y síntesis química de péptidos antigénicos a partir de dichos candidatos.
5. Evaluación del efecto protector de las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos frente a *O. moubata* y *O. erraticus* mediante experimentos de vacunación de conejos y validación, en su caso, como candidatos vacunales.

Conclusión

Primera.

Se han obtenido, por primera vez en una especie de argásido, los transcriptomas y proteomas intestinales de hembras en ayunas y de hembras en las primeras fases de la digestión de la sangre. La caracterización funcional y el análisis de la expresión diferencial entre estos mialomas han proporcionado información inédita sobre los genes y proteínas implicados en el proceso de digestión en argásidos, en particular en el metabolismo y transporte de los nutrientes y en las respuestas defensivas, detoxificantes y antioxidantes desencadenadas por la ingestión de sangre.

Segunda.

La identificación en el mialoma de *O. moubata* de enzimas proteolíticas que pertenecen a las mismas clases/familias de proteasas que las descritas en ixódidos revela que, a pesar de la diferente estrategia alimenticia mostrada por ixódidos y argásidos, el sistema hemoglobinolítico en ambas familias es similar.

Tercera.

Aunque la principal fuente de nutrientes durante la digestión sanguínea en garrapatas son las proteínas, y en particular la hemoglobina y la albúmina, la identificación de numerosos genes y proteínas implicados en el metabolismo y transporte de lípidos y carbohidratos revela que estos componentes también constituyen fuentes nutricionales relevantes y ocupan una parte importante del proceso de digestión de la sangre.

Cuarta.

Los genes y proteínas implicados en los mecanismos de transporte intracelular, en las respuestas defensivas, detoxificantes y respuestas al estrés están estrechamente regulados, poniendo de relieve la complejidad e importancia de estos procesos, los cuales cobran de esta manera un gran interés como dianas para intervenciones terapéuticas y/o inmunológicas.

Quinta.

La identificación de genes implicados en la formación de la matriz peritrófica confirma la existencia de esta estructura en *O. moubata*.

Sexta.

El empleo del transcriptoma como base de datos para la identificación del proteoma ha incrementado notablemente el número de proteínas identificadas, demostrando su enorme utilidad en los análisis proteómicos, especialmente en los efectuados con organismos que no tienen secuenciado su genoma, como es el caso de *O. moubata*.

Séptima.

El análisis comparado de los proteomas intestinales de *O. moubata* antes y después de la alimentación confirma lo observado en otras especies de garrapatas. Esto es, que, al menos durante las primeras fases de la digestión, el proteoma intestinal no experimenta

grandes modificaciones. Por el contrario, el transcriptoma intestinal es mucho más dinámico mostrando variaciones significativas en el nivel de expresión de numerosos genes implicados en los procesos de digestión sanguínea y en las respuestas al estrés oxidativo desencadenados por la alimentación de las garrapatas.

Octava

La disponibilidad y abundancia de datos ómicos nos ha permitido llevar a cabo una selección teórica de antígenos intestinales potencialmente protectores, mediante una estrategia de vacunología reversa, en la que hemos utilizado criterios basados en hipótesis de inmunogenicidad, localización celular, funcionalidad y sobreexpresión tras la alimentación. La evaluación experimental de la eficacia vacunal de los candidatos teóricos confirmó su potencial protector, aunque éste fue medio-bajo para la mayoría de ellos, como Om17, Om85, Om03 y Om99 y, contra todo pronóstico, muy bajo para Om86.

Novena.

Todos los candidatos, salvo Om86, comparten epítomos protectores en *O. moubata* y *O. erraticus*, por lo que podrían usarse como antígenos en vacunas frente a ambas especies. Notablemente, estos candidatos proporcionaron mayor protección frente a *O. erraticus* que frente a *O. moubata*, confirmando las observaciones previas acerca de la menor sensibilidad de *O. moubata* a las vacunas basadas en antígenos ocultos del intestino medio. Atribuimos esta menor sensibilidad a particularidades anatómo-fisiológicas de *O. moubata*, como puede ser la presencia de matriz peritrófica, que no estarían presentes en *O. erraticus*.

Décima.

Ninguno de los candidatos evaluados comparte epítomos con proteínas salivales ni de *O. moubata* ni de *O. erraticus*, por lo que los contactos naturales con estas especies no actúan como dosis antigénicas de recuerdo y, en consecuencia, cabe esperar que el nivel de anticuerpos específicos y la eficacia protectora de los candidatos descendan con el tiempo en ausencia de revacunaciones, tal como se observó en las segundas infestaciones.

Bibliografía

- Akov, S., 1982. Blood meal digestion in ticks, In: Galun, F.D.O.a.R. (Ed.) Physiology of Ticks. Pergamon Press, Oxford, pp. 197-211
- Akov, S., Samish, M., Galun, R., 1976. Protease activity in female *Ornithodoros tholozani* ticks. Acta Tropica 33, 37-52.
- Aljamali, M.N., Hern, L., Kupfer, D., Downard, S., So, S., Roe, B.A., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2009a. Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). Insect Molecular Biology 18, 129-154.
- Aljamali, M.N., Ramakrishnan, V.G., Weng, H., Tucker, J.S., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2009b. Microarray analysis of gene expression changes in feeding female and male lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 71, 236-253.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., De La Fuente, J., 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. Vaccine 21, 1492-1501.
- Anderson, J.M., Sonenshine, D.E., Valenzuela, J.G., 2008. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). BMC Genomics 9, 552.
- Anderson, T.A., Levitt, D.G., Banaszak, L.J., 1998. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. Structure 6, 895-909.
- Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., 1995. A study of the vaccinal value of various extracts of concealed antigens and salivary gland extracts against *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. Veterinary Parasitology 60, 133-147.
- Baranda, J.A., Perez-Sanchez, R., Oleaga-Perez, A., Encinas-Grandes, A., 1997. Antigens of interest for the diagnosis of parasitism in pigs by *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. The Journal of Parasitology 83, 831-838.
- Baranda, J.A., Perez-Sanchez, R., Oleaga, A., Manzano, R., Encinas-Grandes, A., 2000. Purification, N-terminal sequencing and diagnostic value of the major antigens of *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata*. Veterinary Parasitology 87, 193-206.
- Barker, S.C., Murrel, A., 2008. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names, In: Bowman, A.S. y Nuttall, P. (Ed.) Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge University Press, pp. 1-39.

- Ben-Yakir, D., 1989. Quantitative studies of host immunoglobulin G in the hemolymph of ticks (Acari). *Journal of Medical Entomology* 26, 243-246.
- Bhuin, T., Roy, J.K., 2014. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research* 328, 1-19.
- Boinas, F., Ribeiro, R., Madeira, S., Palma, M., de Carvalho, I.L., Nuncio, S., Wilson, A.J., 2014. The medical and veterinary role of *Ornithodoros erraticus* complex ticks (Acari: Ixodida) on the Iberian Peninsula. *Journal of Vector Ecology* 39, 238-248.
- Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Liao, M., Tanaka, T., Xuan, X., Fujisaki, K., 2010. Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development. *Journal of Insect Physiology* 56, 1587-1598.
- Bracher, A., Perrakis, A., Dresbach, T., Betz, H., Weissenhorn, W., 2000. The X-ray crystal structure of neuronal Sec1 from squid sheds new light on the role of this protein in exocytosis. *Structure* 8, 685-694.
- Brake, D.K., Pérez de León, A.A., 2012. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors* 5, 38-38.
- Browman, D.T., Resek, M.E., Zajchowski, L.D., Robbins, S.M., 2006. Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *Journal of Cell Science* 119, 3149-3160.
- Busby, A.T., Ayllon, N., Kocan, K.M., Blouin, E.F., de la Fuente, G., Galindo, R.C., Villar, M., de la Fuente, J., 2012. Expression of heat shock proteins and subolesin affects stress responses, *Anaplasma phagocytophilum* infection and questing behaviour in the tick, *Ixodes scapularis*. *Medical and Veterinary Entomology* 26, 92-102.
- Cabezas-Cruz, A., Alberdi, P., Valdés, J.J., Villar, M., de la Fuente, J., 2017. *Anaplasma phagocytophilum* Infection Subverts Carbohydrate Metabolic Pathways in the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:23. doi: 10.3389/fcimb.2017.00023.
- Canales, M., Almazán, C., Varanjo, V., Jongejan, F., de la Fuente, J. 2009. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 orthologous protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology* 9, 29-36.

- Canals, A., Oleaga, A., Perez, R., Dominguez, J., Encinas, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., 1990. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific antibodies in pigs infested with the tick *Ornithodoros erraticus* (Argasidae). *Veterinary Parasitology* 37, 145-153.
- Carmelo, E.Z., A.I.; González, A.C.; Martínez, E.; Valladares, B. , 2006. Proteínas de choque térmico en parásitos: la Hsp70 y el sistema inmune. *Revista Ibérica de Parasitología* 66 39-46.
- Carney, G.E., Bowen, N.J., 2004. p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biology of the Cell* 96, 271-278.
- Caro-Aguilar, I., Lapp, S., Pohl, J., Galinski, M.R., Moreno, A., 2005. Chimeric epitopes delivered by polymeric synthetic linear peptides induce protective immunity to malaria. *Microbes Infect* 7, 1324-1337.
- Charalambous, K., Booth, P.J., Woscholski, R., Seddon, J.M., Templer, R.H., Law, R.V., Barter, L.M., Ces, O., 2012. Engineering de novo membrane-mediated protein-protein communication networks. *Journal of the American Chemical Society* 134, 5746-5749.
- Chinzei, Y., Minoura, H., 1988. Reduced oviposition in *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae) fed on tick-sensitized and vitellin-immunized rabbits. *Journal of Medical Entomology* 25, 26-31.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J.H., Francischetti, I.M., Kotsyfakis, M., 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics* 75, 3842-3854.
- Chmelar, J., Kotal, J., Karim, S., Kopacek, P., Francischetti, I.M., Pedra, J.H., Kotsyfakis, M., 2016. Sialomes and Mialomes: A Systems-Biology View of Tick Tissues and Tick-Host Interactions. *Trends Parasitol* 32, 242-254.
- Chocu, S., Evrard, B., Lavigne, R., Rolland, A.D., Aubry, F., Jegou, B., Chalmel, F., Pineau, C., 2014. Forty-four novel protein-coding loci discovered using a proteomics informed by transcriptomics (PIT) approach in rat male germ cells. *Biology of Reproduction* 91, 123.
- Čikoš, Š., Bukovská, A., Koppel, J., 2007. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology* 8, 113.

- Citelli, M., Lara, F.A., da Silva Vaz, I., Jr., Oliveira, P.L., 2007. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 151, 81-88.
- Cleator, J.H., Zhu, W.Q., Vaughan, D.E., Hamm, H.E., 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* 107, 2736-2744.
- Contreras, M., de la Fuente, J., 2016. Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine* 34, 3010-3013.
- Costard, S., Mur, L., Lubroth, J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Pfeiffer, D.U., 2013. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus research* 173, 191-197.
- Crispell, G., Budachetri, K., Karim, S., 2016. *Rickettsia parkeri* colonization in *Amblyomma maculatum*: the role of superoxide dismutases. *Parasites and Vectors* 9, 291.
- Cruz, C.E., Fogaca, A.C., Nakayasu, E.S., Angeli, C.B., Belmonte, R., Almeida, I.C., Miranda, A., Miranda, M.T., Tanaka, A.S., Braz, G.R., Craik, C.S., Schneider, E., Caffrey, C.R., Daffre, S., 2010. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasites and Vectors* 3, 63.
- Cutler, S.J., 2006. Possibilities for Relapsing Fever Reemergence. *Emerging Infectious Diseases* 12, 369-374.
- Cutler, S.J., 2010. Relapsing fever – a forgotten disease revealed. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1115-1122.
- Cutler, S.J., Abdissa, A., Trape, J.F., 2009. New concepts for the old challenge of African relapsing fever borreliosis. *Clinical microbiology and infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15, 400-406.
- de la Fuente, J., 2012. Vaccines for vector control: exciting possibilities for the future. *Veterinary Journal (London, England: 1997)* 194, 139-140.
- de la Fuente, J., Merino, O., 2013. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine* 31, 5923-5929.

- de la Fuente, J y Kocan, K.M., 2014. Development of vaccines for control of tick infestations and interruption of pathogen transmission. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol I. Oxford University Press. pp. 333-352.
- de la Fuente, J., Contreras, M., 2015. Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Review of Vaccines* 14, 1367-1376.
- de la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., Perez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews* 8, 23-28.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience* 13, 6938-6946.
- de la Fuente, J., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Kocan, K.M., Zivkovic, Z., Blouin, E.F., Canales, M., Almazan, C., Galindo, R.C., Step, D.L., Villar, M., 2010. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* 28, 1786-1795.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M.P., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazán, C., Blouin, E.F., 2011. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Veterinary Parasitology* 181, 17-22.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Almazan, C., Kocan, K.M., Merino, O., Perez de la Lastra, J.M., Estrada-Pena, A., Blouin, E.F., 2013. Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vectorborne pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases* 60 Suppl 2, 172-178.
- de la Fuente, J., Kopacek, P., Lew-Tabor, A., Maritz-Olivier, C., 2016. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology* 38, 754-769.
- de Marco, A. 2007. Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nature Protocols* 2: 2632-2639.
- Diatta, G., Souidi, Y., Granjon, L., Arnathau, C., Durand, P., Chauvancy, G., Mane, Y., Sarih, M., Belghyti, D., Renaud, F., Trape, J.F., 2012. Epidemiology of tick-borne borreliosis in Morocco. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1810.

- Díaz-Martín, V., 2014. Análisis de la saliva de *Ornithodoros moubata* y producción de antígenos recombinantes para el desarrollo de test serológicos y vacunas antigarrapata. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Roman, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A., Perez-Sanchez, R., 2011. Cloning, characterization and diagnostic performance of the salivary lipocalin protein TSGP1 from *Ornithodoros moubata*. *Veterinary Parasitology* 178, 163-172.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A., Perez-Sanchez, R., 2013a. An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. *Journal Proteomics* 80, 216-235.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A., Perez-Sanchez, R., 2013b. Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Veterinary Parasitology* 191, 301-314.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Obolo-Mvoulouga, P., Oleaga, A., Perez-Sanchez, R., 2015. Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: An update. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 6, 211-220.
- Don, T.A., Bethony, J.M., Loukas, A., 2008. Saposin-like proteins are expressed in the gastrodermis of *Schistosoma mansoni* and are immunogenic in natural infections. *International Journal of Infectious Diseases* 12, e39-e47.
- Donohue, K.V., Khalil, S.M., Mitchell, R.D., Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2008. Molecular characterization of the major hemelipoglycoprotein in ixodid ticks. *Insect Molecular Biology* 17, 197-208.
- Doytchinova, I.A., Flower, D.R., 2007. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 8, 4.
- Dreher-Lesnick, S.M., Mulenga, A., Simser, J.A., Azad, A.F., 2006. Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Molecular Biology* 15, 445-453.
- Dusbabek, F., Kohnova, P., Grubhoffer, L., Lukes, S., 1990. Artificial immunization of pigeons against *Argas polonicus* (Ixodoidea, Argasidae). *Medical and Veterinary Entomology* 4, 315-320.

- EFSA-panel, 2010a. Scientific Opinion on Geographic Distribution of Tick-borne Infections and their Vectors in Europe and the other Regions of the Mediterranean Basin. EFSA Journal 8, 1723-n/a.
- EFSA-panel, 2010b. Scientific Opinion on the Role of Tick Vectors in the Epidemiology of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever and African Swine Fever in Eurasia. EFSA Journal 8, 1703-n/a.
- EFSA-panel, 2010c. Scientific Opinion on African Swine Fever. EFSA Journal 8, 1556-n/a.
- Evans, V.C., Barker, G., Heesom, K.J., Fan, J., Bessant, C., Matthews, D.A., 2012. De novo derivation of proteomes from transcriptomes for transcript and protein identification. Nature Methods 9, 1207-1211.
- Fankhauser, N., Maser, P., 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. Bioinformatics (Oxford, England) 21, 1846-1852.
- Ferguson, S.M., De Camilli, P., 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. Nature reviews. Molecular Cell Biology 13, 75-88.
- Fernandes, E.K., Bittencourt, V.R., 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. Experimental and Applied Acarology 46, 71-93.
- Finn, R.D., Clements, J., Eddy, S.R., 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. Nucleic Acids Research 39, W29-37.
- Flower, D.R., Macdonald, I.K., Ramakrishnan, K., Davies, M.N., Doytchinova, I.A., 2010. Computer aided selection of candidate vaccine antigens. Immunome Research 6 Suppl 2, S1.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. Frontiers in Bioscience (Landmark edition) 14, 2051-2088.
- Franta, Z., Frantová, H., Konvičková, J., Horn, M., Sojka, D., Mareš, M., Kopáček, P., 2010. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. Parasites and Vectors 3, 119.
- Fu, Q., Lynn-Miller, A., Lan, Q., 2011. Characterization of the oxysterol-binding protein gene family in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology 20, 541-552.

- Galindo, R.C., Doncel-Perez, E., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Gortazar, C., Mangold, A.J., Martin-Hernando, M.P., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2009. Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Developmental and Comparative Immunology* 33, 612-617.
- García-Varas, S. 2004. Vacuna anti-*Ornithodoros moubata*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- García-Varas, S., Manzano-Román, R., Fernandez-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Oleaga, A., Perez-Sanchez, R., 2010. Purification and characterisation of a P-selectin-binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *International Journal for Parasitology* 40, 313-326.
- George, J.E., Pound, J.M., Davey, R.B., 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129 Suppl, S353-366.
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P., 2007. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *Journal of Vector Borne Diseases* 44, 79-89.
- Goto, A., Matsushita, K., Gesellchen, V., El Chamy, L., Kutenkeuler, D., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., Akira, S., Boutros, M., Reichhart, J.M., 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nature Immunology* 9, 97-104.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29, 644-652.
- Graça-Souza, A.V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G.O., Braz, G.R., Paes, M.C., Sorgine, M.H., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L., 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 322-335.
- Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L., Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129, S427-S442.
- Grams, R., Adisakwattana, P., Ritthisunthorn, N., Eursitthichai, V., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V., 2006. The saposin-like proteins 1, 2, and 3 of *Fasciola gigantica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 148, 133-143.

- Grandjean, O., 1983. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton females (Ixodoidea: Argasidae) II. Modifications of midgut cells related to the digestive cycle and to the triggering action of mating. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 58, 493-514.
- Grigor'eva, L.A., Amosova, L.I., 2004. Peritrophic matrix in the midgut of tick females of the genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae). *Parazitologiya* 38, 3-11.
- Grunclová L., Fouquier H., Hypsa V., Kopacek P. 2003. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 651–660.
- Grunclová, L., Horn, M., Vancova, M., Sojka, D., Franta, Z., Mares, M., Kopacek, P., 2006. Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity. *Biological Chemistry* 387, 1635-1644.
- Gudderra, N.P., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M., 2002. Hemolymph proteins in ticks. *Journal of Insect Physiology* 48, 269-278.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Perez de Leon, A.A., 2012. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *International Journal for Parasitology* 42, 421-427.
- Guilfoile, P.G., Packila, M., 2004. Identification of four genes expressed by feeding female *Ixodes scapularis*, including three with sequence similarity to previously recognized genes. *Experimental and Applied Acarology* 32, 103-110.
- Habib, S.M., Sewify, G.H., 2002. Biological control of the fowl *Argas (Persicargas) persicus* (Laterreille) by the enthomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metharhizium anisopliae*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 12, 11-13.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New-York, 511-551 pp.
- Hauke, V., 2005. Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochemical Society Transactions* 33, 1285-1289.
- Heekin, A.M., Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Saldivar, L., Scoles, G.A., Dowd, S.E., Gondro, C., Nene, V., Djikeng, A., Brayton, K.A., 2013. Gut transcriptome of replete adult female cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding upon a *Babesia bovis*-infected bovine host. *Parasitology Research* 112, 3075-3090.

- Herrero Asensio, N., Oleaga, A., PÉrez Sánchez, R., Zabalgogezcoa, I., 2011. Tick pathogenicity, thermal tolerance and virus infection in *Tolypocladium cylindrosporium*. *Annals of Applied Biology* 159, 192-201.
- Hoogstraal, H., 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology* 24, 135-238.
- Horigane, M., Shinoda, T., Honda, H., Taylor, D., 2010. Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Molecular Biology* 19, 501-515.
- Horn, M., Nussbaumerova, M., Sanda, M., Kovarova, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Kopacek, P., Mares, M., 2009. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chemistry and Biology* 16, 1053-1063.
- Huber, M.D., Vesely, P.W., Datta, K., Gerace, L., 2013. Erlins restrict SREBP activation in the ER and regulate cellular cholesterol homeostasis. *The Journal of Cell Biology* 203, 427-436.
- Ibeas, E., Fuentes, L., Martin, R., Hernandez, M., Nieto, M.L., 2009. Secreted phospholipase A2 type IIA as a mediator connecting innate and adaptive immunity: new role in atherosclerosis. *Cardiovascular Research* 81, 54-63.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., Mann, M., 2005. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular Cell Proteomics* 4, 1265-1272.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14.
- Jori, F., Vial, L., Penrith, M.L., Pérez-Sánchez, R., Etter, E., Albina, E., Michaud, V., Roger, F., 2013. Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Research* 173, 212-227.

- Kazimírová, M., Stibraniova, I., 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 43.
- King, G., Sharom, F.J., 2012. Proteins that bind and move lipids: MsbA and NPC1. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47, 75-95.
- Kini, R.M., 2005. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 45, 1147-1161.
- Klein, J., 1990. Antigens and other lymphocyte activating substances. In: *Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Cambridge Massachusetts, USA, pp. 269-292.
- Kocan, K.M., De La Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C., 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129, S285-S300.
- Kongsuwan, K., Josh, P., Zhu, Y., Pearson, R., Gough, J., Colgrave, M.L., 2010. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *Journal of Insect Physiology* 56, 212-226.
- Kopáček, P., Vogt, R., Jindrak, L., Weise, C., Safarik, I., 1999. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 989-997.
- Kopáček, P., Weise, C., Saravanan, T., Vitova, K., Grubhoffer, L., 2000. Characterization of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *European Journal of Biochemistry* 267, 465-475.
- Kotsyfakis, M., Schwarz, A., Erhart, J., Ribeiro, J.M., 2015. Tissue- and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Scientific Reports* 5, 9103.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305, 567-580.
- Kumar, D., Bansal, G., Narang, A., Basak, T., Abbas, T., Dash, D., 2016. Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *Proteomics* 16, 2533-2544.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, R., Takeuchi, H., Lomas, L.O., Jonczy, J., Rigden, D.J., Rees, H.H., Turner, P.C., 2004. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1447-1449.
- Laity, J.H., Lee, B.M., Wright, P.E., 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 39-46.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357-359.
- Lara, F.A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I.C., Braga, C.M., Miguens, F.C., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., 2003. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *The Journal of Experimental Biology* 206, 1707-1715.
- Lara, F.A., Pohl, P.C., Gandara, A.C., Ferreira Jda, S., Nascimento-Silva, M.C., Bechara, G.H., Sorgine, M.H., Almeida, I.C., Vaz Ida, S., Jr., Oliveira, P.L., 2015. ATP Binding Cassette Transporter Mediates Both Heme and Pesticide Detoxification in Tick Midgut Cells. *PLoS One* 10, e0134779.
- Larsen, J.E.P., Lund, O., Nielsen, M., 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research* 2, 2.
- Latif, A.A., Putterill, J.F., de Klerk, D.G., Pienaar, R., Mans, B.J., 2012. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. *PLoS One* 7, e41651.
- Lee, J.Y., Cho, P.Y., Kim, T.Y., Kang, S.Y., Song, K.Y., Hong, S.J., 2002. Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonarin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296, 1238-1244.
- Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42, 525-550.
- Lew-Tabor, A.E., Bruyeres, A.G., Zhang, B., Rodriguez Valle, M., 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5, 500-510.

- Lew-Tabor, A.E., Rodriguez Valle, M., 2016. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7, 573-585.
- Li, B., Dewey, C.N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.
- Luge, T., Fischer, C., Sauer, S., 2016. Efficient Application of De Novo RNA Assemblers for Proteomics Informed by Transcriptomics. *Journal of Proteome Research* 15, 3938-3943.
- Maier, T., Guell, M., Serrano, L., 2009. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters* 583, 3966-3973.
- Mans, B.J., Neitz, A.W., 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1-17.
- Mans, B.J., Andersen, J.F., Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Schwan, T.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Hammer, C.H., Ribeiro, J.M., 2008. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 42-58.
- Manzano-Román, 2002. Vacuna anti-*Ornithodoros erraticus*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Manzano-Román, R., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2006. Antigens from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* induce lethal anti-tick immune responses in pigs and mice. *Veterinary Parasitology* 135, 65-79.
- Manzano-Román, R., Garcia-Varas, S., Encinas-Grandes, A., Perez-Sanchez, R., 2007. Purification and characterization of a 45-kDa concealed antigen from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* that induces lethal anti-tick immune responses in pigs. *Veterinary Parasitology* 145, 314-325.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., de la Fuente, J., Ricardo Pérez-Sánchez, R., 2012a. Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control, In: Shah, M.M. (Ed.) *Parasitology*. Intech, Rijeka (Croatia), pp. 125-162.

- Manzano-Román, R., Diaz-Martin, V., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Perez-Sanchez, R., 2012b. Subolesin/akirina orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Veterinary Parasitology* 185, 248-259.
- Manzano-Román, R., Diaz-Martin, V., Gonzalez-Gonzalez, M., Matarraz, S., Alvarez-Prado, A.F., LaBaer, J., Orfao, A., Perez-Sanchez, R., Fuentes, M., 2012c. Self-assembled protein arrays from an *Ornithodoros moubata* salivary gland expression library. *Journal of Proteome Research* 11, 5972-5982.
- Manzano-Román, R., Diaz-Martin, V., Oleaga, A., Perez-Sanchez, R., 2015. Identification of protective linear B-cell epitopes on the subolesin/akirin orthologues of *Ornithodoros* spp. soft ticks. *Vaccine* 33, 1046-1055.
- Maris, C., Dominguez, C., Allain, F.H., 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *The FEBS journal* 272, 2118-2131.
- Maritz-Olivier, C., van Zyl, W., Stutzer, C., 2012. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 3, 179-187.
- Massiah, M.A., Wright, K.M., Du, H., 2016. Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 Minimal Media. *Current Protocols in Protein Science* 84, 6.13.11-16.13.24.
- Matsuo, T., Sato, M., Inoue, N., Yokoyama, N., Taylor, D., Fujisaki, K., 2003. Morphological studies on the extracellular structure of the midgut of a tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 90, 243-248.
- May, A.P., Whiteheart, S.W., Weis, W.I., 2001. Unraveling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimide-sensitive factor. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 21991-21994.
- Ment, D., Gindin, G., Rot, A., Eshel, D., Teper-Bamnolker, P., Ben-Ze'ev, I., Glazer, I., Samish, M., 2013. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. *Biocontrol Science and Technology* 23, 956-967.
- Merino, O., Alberdi, P., Perez de la Lastra, J.M., de la Fuente, J., 2013. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, 30.

- Mi, H., Muruganujan, A., Thomas, P.D., 2013. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research* 41, D377-386.
- Minoura, H., Chinzei, Y., Kitamura, S., 1985. *Ornithodoros moubata*: Host immunoglobulin G in tick hemolymph. *Experimental Parasitology* 60, 355-363.
- Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Alim, M.A., Hatta, T., Huang, X., Fujisaki, K., 2008. A set of serine proteinase paralogs are required for blood-digestion in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitology International* 57, 499-505.
- Moller, S., Croning, M.D., Apweiler, R., 2001. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics (Oxford, England)* 17, 646-653.
- Moreno-Cid, J.A., Perez de la Lastra, J.M., Villar, M., Jimenez, M., Pinal, R., Estrada-Pena, A., Molina, R., Lucientes, J., Gortazar, C., de la Fuente, J., 2013. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine* 31, 1187-1196.
- Moreti, R., Perrella, N.N., Lopes, A.R., 2013. Carbohydrate digestion in ticks and a digestive alpha-L-fucosidase. *Journal of Insect Physiology* 59, 1069-1075.
- Morrissey, J.H., 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* 117, 307-310.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 5, 621-628.
- Murakami, M., Sato, H., Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., 2015. A new era of secreted phospholipase A(2). *Journal of Lipid Research* 56, 1248-1261.
- Nakajima, Y., Van Der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., Yamakawa, M., 2002. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Molecular Biology* 11, 611-618.
- Nakaya, H.I., Li, S., Pulendran, B., 2012. Systems vaccinology: learning to compute the behavior of vaccine induced immunity. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems Biology and Medicine* 4, 193-205.
- Narasimhan, S., Fikrig, E., 2015. Tick microbiome: the force within. *Trends in Parasitology* 31, 315-323.

- Need, J.T., Butler, J.F., 1991. Possible applications of the immune response of laboratory mice to the feeding of argasid ticks. *Journal of Medical Entomology* 28, 250-253.
- Nuttall, P.A., Trimmell, A.R., Kazimirova, M., Labuda, M., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology* 28, 155-163.
- Oleaga-Perez, A., Perez-Sanchez, R., Encinas-Grandes, A., 1990. Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *The Veterinary Record* 126, 32-37.
- Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Encinas-Grandes, A., 1994. Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. *Veterinary Parasitology* 52, 97-111.
- Oleaga, A., Escudero-Población, A., Camafeita, E., Pérez-Sánchez, R., 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1149-1159.
- Oleaga, A., Obolo-Mvoulouga, P., Manzano-Román, R., Pérez-Sánchez, R., 2015. Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. *Parasites and Vectors* (2015) 8:525.
- Oliveira, C.J., Anatriello, E., de Miranda-Santos, I.K., Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Ferreira, B.R., Ribeiro, J.M., 2013. Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 4, 469-477.
- Owen, D.J., Collins, B.M., Evans, P.R., 2004. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 153-191.
- Pacello, F., Langford, P.R., Kroll, J.S., Indiani, C., Smulevich, G., Desideri, A., Rotilio, G., Battistoni, A., 2001. A novel heme protein, the Cu,Zn-superoxide dismutase from *Haemophilus ducreyi*. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 30326-30334.
- Paes, M.C., Oliveira, M.B., Oliveira, P.L., 2001. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 63-71.

- Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz, I., Jr., 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Veterinary Journal* (London, England : 1997) 194, 158-165.
- Penrith, M.L., Vosloo, W., Jori, F., Bastos, A.D.S., 2013. African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Research* 173, 228-246.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1992. Analysis of the specificity of the salivary antigens of *Ornithodoros erraticus* for the purpose of serological detection of swine farms harbouring the parasite. *Parasite Immunology* 14, 201-216.
- Pérez-Sánchez, R., Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Encinas-Grandes, A., 1994. Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of Salamanca, Spain. *The Veterinary Record* 135, 207-209.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Díaz-Martín, V., De La Torre, E., Hernández-González, A., Manzano-Román, R., 2010. Aplicación de ecualizadores de proteínas para la identificación de antígenos minoritarios de *Ornithodoros moubata*. *Proteómica* 5, 143-145.
- Perner, J., Provaznik, J., Schrenkova, J., Urbanova, V., Ribeiro, J.M., Kopacek, P., 2016. RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Report* 6, 36695.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8, 785-786.
- Polar, P., Moore, D., Kairo, M.T., Ramsubhag, A., 2008. Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Experimental and Applied Acarology* 46, 119-148.
- Popara, M., Villar, M., Mateos-Hernandez, L., de Mera, I.G., Marina, A., del Valle, M., Almazan, C., Domingos, A., de la Fuente, J., 2013. Lesser protein degradation machinery correlates with higher BM86 tick vaccine efficacy in *Rhipicephalus annulatus* when compared to *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 31, 4728-4735.
- Popara, M., Villar, M., de la Fuente, J., 2015. Proteomics characterization of tick-host-pathogen interactions. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 1247, 513-527.

- Pourseyed, S.H., Tavassoli, M., Bernousi, I., Mardani, K., 2010. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): an effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology* 172, 305-310.
- Prudencio, C.R., Pérez de la Lastra, J.M., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J., 2010. Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine* 28, 5398-5406.
- Quembo, C.J., Jori, F., Heath, L., Pérez-Sánchez, R., Vosloo, W., 2016. Investigation into the Epidemiology of African Swine Fever Virus at the Wildlife – Domestic Interface of the Gorongosa National Park, Central Mozambique. *Transboundary and Emerging Diseases* 63, 443-451.
- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A., 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology* 152, 294-313.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., Mann, M., 2002. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research* 12, 1231-1245.
- Ravaomanana, J., Jori, F., Vial, L., Pérez-Sánchez, R., Blanco, E., Michaud, V., Roger, F., 2011. Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 247-254.
- Reboudet, S., Parola, P., 2006. Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 48, 11-15.
- Rees, H.H., 2004. Hormonal control of tick development and reproduction. *Parasitology* 129 Suppl, S127-143.
- Ren, Q., Liu, Z., Guan, G., Sun, M., Ma, M., Niu, Q., Li, Y., Liu, A., Liu, J., Yang, J., Yin, H., Luo, J., 2012. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control* 63, 98-101.
- Ren, Q., Sun, M., Guan, G., Liu, Z., Chen, Z., Liu, A., Li, Y., Ma, M., Yang, J., Niu, Q., Liu, J., Han, X., Yin, H., Luo, J., 2014. Susceptibility of the tick *Haemaphysalis qinghaiensis* to isolates of the fungus *Metarhizium anisopliae* in China. *Experimental and Applied Acarology* 64, 253-258.

- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M., 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. BMC Genomics 12, 136.
- Ribeiro, J.M., Labruna, M.B., Mans, B.J., Maruyama, S.R., Francischetti, I.M., Barizon, G.C., de Miranda Santos, I.K., 2012. The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. Insect Biochemistry and Molecular Biology 42, 332-342.
- Richards, S.A., Stutzer, C., Bosman, A.-M., Maritz-Olivier, C., 2015. Transmembrane proteins – Mining the cattle tick transcriptome. Ticks and Tick-Borne Diseases 6, 695-710.
- Saha, S., Raghava, G.P.S., 2004. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties, In: Nicosia, G., Cutello, V., Bentley, P.J., Timmis, J. (Eds.) Artificial Immune Systems: Third International Conference, ICARIS 2004, Catania, Sicily, Italy, September 13-16, 2004. Proceedings. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 197-204.
- Saha, S., Raghava, G.P., 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. Proteins 65, 40-48.
- Saier, M.H., Jr., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jahn, P.S., Lew, K., Liu, J., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Tseng, T.T., Virk, P.S., 1999. The major facilitator superfamily. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 1, 257-279.
- Salat, J., Paesen, G.C., Rezacova, P., Kotsyfakis, M., Kovarova, Z., Sanda, M., Majtan, J., Grunclova, L., Horka, H., Andersen, J.F., Brynda, J., Horn, M., Nunn, M.A., Kopacek, P., Kopecky, J., Mares, M., 2010. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. The Biochemical Journal 429, 103-112.
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2008. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives, In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds.) Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 447-469.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Martínez-López, B., 2012. African swine fever: an epidemiological update. Transboundary and Emerging Diseases 59 Suppl 1, 27-35.

- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J.C., Carrasco, L., 2015. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *Journal of Comparative Pathology* 152, 9-21.
- Sayed, M.A., Habeeb, S., El Kammah, K.M., 2001. Chicken immunological reaction to salivary gland proteins of *Argas persicus* (Oken) (acari: argasidae). *International Journal of Acarology* 27, 145-149.
- Sayed, M.A., El Kammah, K.M., El-Fiky, Z.A., 2004. A preliminary study on the DNA-vaccine for chicken protection against tick *Argas persicus* (Oken, 1818). *Arab Journal of Biotechnology* 7, 273-282.
- Schägger, H., 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1, 16-22.
- Schulz, M.H., Zerbino, D.R., Vingron, M., Birney, E., 2012. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics (Oxford, England)* 28, 1086-1092.
- Schwarz, A., Tenzer, S., Hackenberg, M., Erhart, J., Gerhold-Ay, A., Mazur, J., Kuharev, J., Ribeiro, J.M., Kotsyfakis, M., 2014. A systems level analysis reveals transcriptomic and proteomic complexity in *Ixodes ricinus* midgut and salivary glands during early attachment and feeding. *Molecular and Cellular Proteomics : MCP* 13, 2725-2735.
- Sewify, G.H., Habib, S.M., 2001. Biological control of the tick fowl *Argas persicargas persicus* by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Anzeiger für Schädlingskunde = Journal of Pest Science* 74, 121-123.
- Shayman, J.A., Kelly, R., Kollmeyer, J., He, Y., Abe, A., 2011. Group XV phospholipase A(2), a lysosomal phospholipase A(2). *Progress in Lipid Research* 50, 1-13.
- Shields, M.J., Fischer, J.J., Wieden, H.J., 2009. Toward understanding the function of the universally conserved GTPase HflX from *Escherichia coli*: a kinetic approach. *Biochemistry* 48, 10793-10802.
- Six, A., Bellier, B., Thomas- Vaslin, V., Klatzmann, D., 2012. Systems biology in vaccine design. *Microbial Biotechnology* 5, 295-304.
- Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J., Raghavan, R., 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. *Genome Biology and Evolution* 7, 831-838.

- Smolenaars, M.M., Madsen, O., Rodenburg, K.W., Van der Horst, D.J., 2007. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *Journal of Lipid Research* 48, 489-502.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Caffrey, C.R., Mareš, M., Kopáček, P., 2013. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology* 29, 276-285.
- Sojka, D., Pytelkova, J., Perner, J., Horn, M., Konvickova, J., Schrenkova, J., Mares, M., Kopacek, P., 2016. Multienzyme degradation of host serum albumin in ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7, 604-613.
- Sonenshine, D.E. y Anderson, J.M., 2014. Mouthparts and Digestive System: Anatomy and Molecular Biology of Feeding and Digestion. In: Sonenshine, D.E. y Roe, R.M. (Ed.) *Biology of Ticks*, Vol I. Oxford University Press. pp. 122-162.
- Sonenshine, D.E., Lange, R.S., Nicholson, W.L., 2002. Ticks (Ixodidae). In: Müllen, G., Durden, L., (Ed.). *Medical and Veterinary Entomology*. London Academic Press. pp. 518-558.
- Sousa, R., Lafer, E.M., 2015. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2: 26. doi: 10.3389/fmolb.2015.00026.
- Stutzer, C., Mans, B.J., Gaspar, A.R., Neitz, A.W., Maritz-Olivier, C., 2009. *Ornithodoros savignyi*: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. *Experimental Parasitology* 122, 318-327.
- Stutzer, C., van Zyl, W.A., Olivier, N.A., Richards, S., Maritz-Olivier, C., 2013. Gene expression profiling of adult female tissues in feeding *Rhipicephalus microplus* cattle ticks. *International Journal for Parasitology* 43, 541-554.
- Taheri, M., Nabian, S., Ranjbar, M., Mazaheri Nezhad, R., Gerami Sadeghian, A., Sazmand, A., 2014. Study of vitellogenin in *Boophilus annulatus* tick larvae and its immunological aspects. *Tropical biomedicine* 31, 398-405.
- Takechi, R., Galay, R.L., Matsuo, T., Maeda, H., Kusakisako, K., Talactac, M.R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T., 2016. Role of the tumor necrosis factor receptor-associated factor-type zinc finger domain containing protein 1 (TRAFD1) from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* in immunity against bacterial infection. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 7, 36-45.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Trape, J.F., Diatta, G., Arnathau, C., Bitam, I., Sarih, M., Belghyti, D., Bouattour, A., Elguero, E., Vial, L., Mane, Y., Balde, C., Prugnolle, F., Chauvancy, G., Mahe, G., Granjon, L., Duplantier, J.M., Durand, P., Renaud, F., 2013. The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in West and North Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida). *PLoS One* 8, e78473.
- Trimnell, A.R., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine* 20, 3560-3568.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 35, W71-74.
- van Zyl, W.A., Stutzer, C., Olivier, N.A., Maritz-Olivier, C., 2015. Comparative microarray analyses of adult female midgut tissues from feeding *Rhipicephalus* species. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 6, 84-90.
- Vargas, M., Montero, C., Sanchez, D., Perez, D., Valdes, M., Alfonso, A., Joglar, M., Machado, H., Rodriguez, E., Mendez, L., Leonart, R., Suarez, M., Fernandez, E., Estrada, M.P., Rodriguez-Mallon, A., Farnos, O., 2010. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Veterinary Research* 6, 43.
- Vial, L., 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite (Paris, France)* 16, 191-202.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology* 5, 520.
- Villar, M., Popara, M., Ayllon, N., Fernandez de Mera, I.G., Mateos-Hernandez, L., Galindo, R.C., Manrique, M., Tobes, R., de la Fuente, J., 2014. A systems biology approach to the characterization of stress response in *Dermacentor reticulatus* tick unfed larvae. *PLoS One* 9, e89564.

- Wang, B., Dukarevich, M., Sun, E.I., Yen, M.R., Saier, M.H., 2009. Membrane Porters of ATP-Binding Cassette Transport Systems Are Polyphyletic. *The Journal of Membrane Biology* 231, 1-10.
- Watson, P.J., Frigerio, G., Collins, B.M., Duden, R., Owen, D.J., 2004. Gamma-COP appendage domain - structure and function. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5, 79-88.
- Wikel, S., 2013. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in Microbiology* 4, 337.
- Willadsen, P., 2008. Anti-tick vaccines. In: Bowman, A.S., Nuttall, P. (Ed.). *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, pp. 424-446
- Wilson, A.J., Ribeiro, R., Boinas, F., 2013. Use of a Bayesian network model to identify factors associated with the presence of the tick *Ornithodoros erraticus* on pig farms in southern Portugal. *Preventive Veterinary Medicine* 110, 45-53.
- Xu, X.L., Cheng, T.Y., Yang, H., Liao, Z.H., 2016. De novo assembly and analysis of midgut transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of genes involved in blood digestion, feeding and defending from pathogens. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 38, 62-72.
- Zabalgogezcoa, I., Oleaga, A., Perez-Sanchez, R., 2008. Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology* 158, 336-343.
- Zhu, K., Bowman, A.S., Dillwith, J.W., Sauer, J.R., 1998. Phospholipase A2 Activity in Salivary Glands and Saliva of the Lone Star Tick (Acari: Ixodidae) During Tick Feeding. *Journal of Medical Entomology* 35, 500-504.
- Zhu, Z., Gern, L., Aeschlimann, A., 1991. The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*. *Parasitology Research* 77, 635-641.

Anexo. Publicaciones



Mini Review

Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: An update

Verónica Díaz-Martín, Raúl Manzano-Román, Prosper Obolo-Mvoulouga,
Ana Oleaga, Ricardo Pérez-Sánchez*

Parasitología Animal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2015

Received in revised form 4 March 2015

Accepted 5 March 2015

Available online 14 March 2015

Keywords:

Soft ticks

Ornithodoros

Vaccines

Concealed antigens

Salivary antigens

ABSTRACT

Ticks are parasites of great medical and veterinary importance since they are vectors of numerous pathogens that affect humans, livestock and pets. Among the argasids, several species of the genus *Ornithodoros* transmit serious diseases such as tick-borne human relapsing fever (TBRF) and African Swine Fever (ASF). In particular, *Ornithodoros erraticus* is the main vector of these two diseases in the Mediterranean while *O. moubata* is the main vector in Africa. The presence of these *Ornithodoros* ticks in domestic and peridomestic environments may greatly hinder the eradication of TBRF and ASF from endemic areas. In addition, there is a constant threat of reintroduction and spreading of ASF into countries from where it has been eradicated (Spain and Portugal) or where it was never present (the Caucasus, Russia and Eastern Europe). In these countries, the presence of *Ornithodoros* vectors could have a tremendous impact on ASF transmission and long-term maintenance. Therefore, elimination of these ticks from at least synanthropic environments would contribute heavily to the prevention and control of the diseases they transmit. Tick control is a difficult task and although several methods for such control have been used, none of them has been fully effective against all ticks and the problems they cause. Nevertheless, immunological control using anti-tick vaccines offers an attractive alternative to the traditional use of acaricides. The aim of the present paper is to offer a brief overview of the current status in control measure development for *Ornithodoros* soft ticks, paying special attention to the development of vaccines against *O. erraticus* and *O. moubata*. Thus, our contribution includes an analysis of the chief attributes that the ideal antigens for an anti-tick vaccine should have, an exhaustive compilation and analysis of the scant anti-soft tick vaccine trials carried out to date using both concealed and salivary antigens and, finally, a brief description of the new reverse vaccinology approaches currently used to identify new and more effective protective tick antigens.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Ticks are cosmopolitan blood-sucking ectoparasites of mammals, birds and reptiles. Ticks belong to two main families, the Argasidae (soft ticks) and the Ixodidae (hard ticks), which share common basic properties but differ in their morphology, biology and ecology. A monotypic third tick family is Nuttalliellidae, whose sole species (*Nuttalliella namaqua*) possesses features of soft and hard ticks and is considered the missing link between the main two families (Hoogstraal, 1956; Latif et al., 2012; Manzano-Román et al., 2012a).

Typically, ixodids are exophilic ticks that remain on the soil and vegetation and actively seek hosts when the season is suitable. After attachment to an adequate host they feed for several days, ingesting enormous amounts of blood and once engorged they then drop off the host returning to the soil, where they moult or, in the case of females, oviposit and die. By contrast, argasid ticks tend to be endophilic/nidicolous parasites. In the natural environment they live inside the nests and burrows of their hosts and in synanthropic environments they colonize animal facilities and human dwellings, where they remain protected from adverse climatic conditions and have regular access to host blood. Most argasids are fast feeders (they feed in less than 1 h) ingesting a relatively small amount of blood per meal and adult specimens can feed and reproduce repeatedly. Argasids are very resistant to starvation and can even survive for several years without feeding (Mans and Neitz, 2004; Oleaga et al., 1990; Sonenshine et al., 2002; Vial, 2009).

Ticks are parasites of great medical and veterinary importance because they are the vectors of numerous pathogens including

* Corresponding author. Tel.: +34 923219606; fax: +34 923219609.

E-mail addresses: veronica.diaz@irnasa.csic.es (V. Díaz-Martín),

raul.manzano@irnasa.csic.es (R. Manzano-Román), prosper.obolo@irnasa.csic.es

(P. Obolo-Mvoulouga), ana.oleaga@irnasa.csic.es (A. Oleaga),

ricardo.perez@irnasa.csic.es (R. Pérez-Sánchez).

viruses, bacteria, protozoa and helminths, all of which affect humans, livestock and pets (de la Fuente et al., 2008; Jones et al., 2008). In addition, their feeding can cause direct damage to their hosts such as significant blood loss, paralysis, toxicosis, irritation, allergy and tissue destruction (Jongejan and Uilenberg, 2004).

Regarding the pathogens transmitted by argasids, these are mainly viruses and bacteria. Among the currently recognized viral diseases transmitted by soft ticks, African Swine Fever (ASF) is particularly important. In addition, most of the bacteria transmitted by argasids are *Borrelia* species that cause relapsing fever in humans (Manzano-Román et al., 2012a).

There are two types of human relapsing fever: the epidemic or louse-borne type, caused by *Borrelia recurrentis* and transmitted by the human body louse *Pediculus humanus*, and the endemic or tick-borne (TBRF) type caused by many different *Borrelia* species, which are all of them transmitted by soft ticks of the genus *Ornithodoros*. TBRF is characterized by episodes of recurring fever and non-specific symptoms such as headache, myalgia, arthralgia, chills and abdominal pains. TBRF is highly endemic in some east African countries, namely Tanzania, where it affects the 6.4% of population and is responsible for up to 436 per 1000 perinatal mortality rates. In Eurasia and the Americas TBRF is more sporadic affecting mainly humans who enter caves, ruins, or animal shelters infested with soft ticks (Cutler, 2006, 2010; Diatta et al., 2012; Rebaudet and Parola, 2006).

ASF is caused by the African swine fever virus (ASFV), which is the only known DNA virus with an arthropod vector (Penrith et al., 2013). ASF is a haemorrhagic fever disease of pigs with mortality rates approaching 100%. It causes major economic losses, threatens food security and limits pork production in affected countries. The disease was originally confined to Africa until it spread to Europe in the middle of the last century and later also to South America and the Caribbean. In Europe (except Sardinia) and the Americas the infection was eradicated via drastic control and eradication programmes. However, in 2007 the disease was introduced into Georgia, from where it rapidly spread to neighbouring Trans-Caucasian countries, the Russian Federation and Eastern Europe, and then recently into the European Union (OIE WAHID, visited December 4th 2014). There is no vaccine against ASFV and this limits the options for disease control (Costard et al., 2013; Sánchez-Vizcaíno et al., 2012, 2015).

As mentioned above, these two diseases – TBRF and ASF – are transmitted by soft tick species of the genus *Ornithodoros*. In particular, *O. moubata* is their main vector in Africa and *O. erraticus* is their main vector in the Mediterranean Basin (Costard et al., 2013; Cutler, 2010). Moreover, *O. erraticus* is the type species of the *O. erraticus* complex, which includes among others several species such as *O. alactagalis*, *O. asperus*, *O. pavlovskyi*, *O. tartakovskyi*, *O. tholozani* and *O. lahorensis*. These species are distributed throughout the Middle East, the Caucasus and the Russian Federation, where ASF is currently spreading. Although not yet experimentally proved, these species are suspected to be competent vectors for ASFV; should this be the case, they could have a tremendous impact on the transmission and long-term maintenance of ASF in this broad region (EFSA panel, 2010a,b,c).

The presence of *Ornithodoros* ticks in domestic and peridomestic environments is an enormous pitfall in the eradication of TBRF and ASF from endemic areas. In addition, the presence of *Ornithodoros* populations also worsens the constant threat of reintroduction, spreading and maintenance of ASF into countries from where it has been eradicated, such as Spain and Portugal, or where it was never present (Boinas et al., 2013; Costard et al., 2013; Sánchez-Vizcaíno et al., 2012, 2015; Wilson et al., 2013). Accordingly, elimination of these ticks from at least synanthropic environments would be of great help in the prevention and control of the diseases they transmit.

The aim of the present paper is to offer a brief overview of the current status in control measure development for *Ornithodoros* soft ticks, paying special attention to development of vaccines against *O. erraticus* and *O. moubata*.

Methods for tick control

Control of tick infestations and tick-produced damages represent a multifaceted problem that remains unsolved since none of the control methods applied to date has been fully effective against all ticks (Manzano-Román et al., 2012a). The control of tick populations has been essentially based on the use of chemical acaricides (arsenicals, chlorinated hydrocarbons, organophosphates, carbamates and synthetic pyrethroids). However, these products have severe drawbacks such as environmental pollution, the contamination of animal products and the selection of resistant tick strains, which greatly reduces the usefulness and average useful life of the agent on the market (George et al., 2004; Ghosh et al., 2007; Graf et al., 2004; Guerrero et al., 2012). In addition, the use of acaricides against *Ornithodoros* ticks is inefficient because of their nidicolous/endophilic lifestyle, which means that it is not possible to ensure that these agents will reach all places where these parasites hide (Astigarraga et al., 1995).

The problems associated with the use of acaricides together with the high costs involved in the development and commercialization of new chemical agents (Guerrero et al., 2012) have encouraged the quest for alternative methods for tick control, including anti-tick vaccines and bio-control with agents such as parasitoids, predators and entomopathogenic organisms, mostly fungi, bacteria and nematodes (Samish et al., 2008).

Among these bio-control agents, the only ones tested against soft ticks to date have been entomopathogenic fungi (Samish et al., 2008). These organisms, and particularly the species *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, have been shown to be effective against ticks in several laboratory and field studies (Fernandes and Bittencourt, 2008; Ment et al., 2013; Polar et al., 2008; Ren et al., 2014). However, such studies have focused almost exclusively on the control of ixodid ticks and have neglected argasid ticks. There are some exceptions to this rule, such as the works of Sewify and Habib (2001) and Habib and Sewify (2002), who studied the pathogenic effect of *M. anisopliae* and *B. bassiana* on *Argas persicus*. These authors sprayed heavily infested poultry houses with fungal spore suspensions and observed that the argasid population disappeared in 3 weeks. There is also the work of Pourseyed et al. (2010), who obtained up to 100% mortality in larvae and females of *Argas persicus* treated with *M. anisopliae* under laboratory conditions. Finally, also interesting are the works of Zabalgoitia et al. (2008) and Herrero et al. (2011), who carried out laboratory trials showing that several isolates of *B. bassiana* and *Tolypocladium cylindrosporum* caused up to 70% mortality in *O. erraticus* and up to 40% mortality in *O. moubata*. Therefore, further investigations for developing entomopathogenic fungal strains as anti-argasid biocontrol agents seems to be justified (Manzano-Román et al., 2012a).

Immunological control using anti-tick vaccines offers an even more attractive method than entomopathogenic fungi for replacing and/or supplementing the use of chemical acaricides. The last decade of the twentieth century saw the advent of the first two commercial anti-tick vaccines (TickGARD® in Australia and GAVAC® in Latin America). Both vaccines were directed towards the ixodid tick *Rhipicephalus microplus* and were based on the antigen Bm86, which is a glycoprotein expressed on the luminal membrane of midgut epithelial cells, hidden from the host's immune system and consequently considered a concealed antigen (Willadsen, 2008).

Although with variable efficacy, the application of these two vaccines during the last two decades has shown that host vaccination is a suitable and sustainable method for the control of tick populations. The implementation of anti-tick vaccines in integrated control programmes permits a reduction in the use of acaricides, which in turn decreases treatment costs. Reduced acaricide use also decreases the likelihood of acaricide resistance development, thus prolonging the average commercial life of acaricide agents (de la Fuente et al., 2007; Guerrero et al., 2012; Vargas et al., 2010; Willadsen, 2008).

Despite this success and the ensuing intensive investigation carried out in this field during the last twenty years (especially in ixodid ticks), the development of new and more effective anti-tick vaccines has been slower than expected and no new anti-tick vaccine has yet been commercialized. Several economic reasons have contributed to this delay but the main reason has been the difficulty involved in identifying new and highly protective tick antigens (Guerrero et al., 2012; Willadsen, 2008).

As a result, at present there is only a limited repertoire of vaccine candidate antigens and these come mostly from hard ticks (Guerrero et al., 2012; Merino et al., 2013; Parizi et al., 2012; Willadsen, 2008). Regarding soft ticks, the number of candidate antigens for vaccine development is even lower than for hard ticks. Thus, there is an urgent need to identify new tick protective antigens to increase the chance of developing successful anti-tick vaccines.

Desirable attributes in candidate antigens for the development of anti-tick vaccines

There is a fair degree of consensus regarding the main attributes that an ideal antigen for an anti-tick vaccine must have (de la Fuente et al., 2011; de la Fuente, 2012; Flower et al., 2010; Guerrero et al., 2012; Maritz-Olivier et al., 2012; Moreno-Cid et al., 2013; Parizi et al., 2012; Wikel, 2013). These attributes would be as follows.

First, the target antigen must be easily accessible to the host immune effectors (i.e., antibodies) ingested during blood feeding. Accordingly, secreted salivary proteins (exposed antigens) and membrane proteins expressed on the luminal surface of midgut cells (concealed antigens) could be suitable candidate antigens. In addition, since host immunoglobulins can pass from the gut lumen to the haemolymph (Chinzei and Minoura, 1988; Nuttall et al., 2006) other concealed antigens from internal organs bathed by haemolymph would also be suitable. Salivary exposed antigens seems quite attractive since these antigens elicit an immune response during tick infestations, and a vaccine based on such antigens would prime a vaccinated animal's immune response against tick infestation. However, some authors have expressed some reserve regarding salivary exposed antigens since the co-evolution of the tick-host interaction has likely led to the development by ticks of means to circumvent the host immune system's response to exposed antigens (Brake and Pérez de León, 2012). In this sense, "silent" salivary antigens might be more adequate because are not subjected to selective pressure by the host immune system and ticks would have not evolved mechanisms to protect them. These would include all the tick secreted salivary antigens that are not recognized by host immunity upon repeated exposure to ticks, but that can be recognized by a vaccine-induced response, as was observed for the *Ixodes scapularis* sialostatin L2 (Kotsyfakis et al., 2008). This type of antigen would allow the development of dual-action vaccines, in which tick infestations on vaccinated animals would act as boosting antigen doses (Trimnell et al., 2002).

Second, the antigen should have a critical function in the tick such that the disruption of that function would lead either to lethality or reduced fecundity at levels that impact the tick population.

Third, it would be also desirable candidate antigens encoded by unigenes or by low copy-number genes not included in any family. The aim is to prevent redundant family members from taking up the function of the targeted member and favour specific blockage of crucial functions in ticks.

Fourth, the antigen should share conserved epitopes among several tick species and, ideally, among other arthropod vectors to protect against multiple vector infestations.

Finally, it would be also very appropriate that the protective antigen could reduce the vector capacity for the transmission of vector-borne pathogens.

None of the candidates currently available fulfil all these requirements and the most effective ones meet only two or three criteria. For example, the Bm86 glycoprotein and the subolesin/akirin orthologues are both examples of concealed antigens; they are also highly conserved in different tick species, and they also reduce vector capacity for the transmission of pathogens (de la Fuente et al., 2011).

Taking the above-mentioned concepts into consideration, a number of current research programmes are prioritizing the identification of membrane-associated or membrane-bound antigens that are expressed in the midgut or ovary and that share cross-reacting epitopes (due to sequence similarity) with proteins secreted into the saliva. These antigens would be the basis for dual-action vaccines and these vaccines are considered to be the most promising ones (Guerrero et al., 2012). The primary example of this kind of cross-reacting dual action antigen is the *Rhipicephalus appendiculatus* cement antigen 64TRP (Trimnell et al., 2002, 2005). A second example of potential dual-action antigen would be the *R. microplus* antigen 2, which is a gut antigen sharing sequence similarity to a secreted homolog in salivary glands (Guerrero et al., 2012; Rachinsky et al., 2008). This antigen may be a dual action candidate since it may elicit cross-protective antibodies that might recognize the salivary homolog as well due to conserved epitopes.

Consistent with the above priority, the gut transcriptomes and proteomes from some ixodid ticks have begun to be analyzed, and those from *Dermacentor variabilis* (Anderson et al., 2008) and *R. microplus* (Heekin et al., 2013; Kongsuwan et al., 2010; Popara et al., 2013; Rachinsky et al., 2008) have recently been published. Regarding argasid ticks, no gut transcriptome or proteome has been published to date, although the salivomes from four species of this family are already available (Díaz-Martín et al., 2013a; Francischetti et al., 2009), and this may serve as a reference in the search for antigens for dual-action vaccines.

Update on the development of vaccines against ornithodoros soft ticks

To date, studies aimed at developing vaccines against soft ticks have been notably less abundant than the focused on hard ticks and have addressed just a few species belonging to the genera *Ornithodoros* and *Argas* (Table 1). Regarding *Argas* sp., the studies available include the work of Dusbábeck et al. (1990) on *Argas polonicus* and the works of Sayed et al. (2001, 2004) on *Argas persicus*. Regarding *Ornithodoros* sp., the studies available are the work of Chinzei and Minoura (1988) and Salat et al. (2010) on *O. moubata*, the work of Need and Butler (1991) on *Ornithodoros turicata* and *Ornithodoros talaje*, and the studies carried out by our own team on *O. erraticus* and *O. moubata*. In these contributions, the protective efficacy of both salivary and concealed antigens has been examined.

Concealed antigens

The first study with this type of antigen in soft ticks was performed by Chinzei and Minoura (1988), who immunized

Table 1

Vaccine trials using concealed and salivary antigens from soft ticks.

Species	Antigen name	Protein identity	Protein type	Protein function	Host	Protection	Reference
Concealed antigens							
<i>Argas polonicus</i>	LH	–	Larval homogenate	–	Pigeon	60% reduction in engorged larvae	Dusbábeck et al. (1990)
<i>Argas persicus</i>	DNA from eggs	–	–	–	Chicken	75–89% rejection of feeding ticks	Sayed et al. (2004)
<i>O. erraticus</i>	Haemolymph	–	Soluble fraction of tissue extracts	–	Pig	No protection	Astigarraga et al. (1995)
	Synganglion	–		–			
	Coxal glands	–		–			
	Midgut	–		–			
	GME	–	Membrane proteins (insoluble fraction of midgut extract)	–	Pig	80% reduction in nymphs survival, 50% reduction in female feeding and fecundity	Manzano-Román et al. (2006)
	GME	–	Membrane proteins (insoluble fraction of midgut extract)	–	Mouse	67% and 29% reduction in nymphs and larvae survival, respectively	Manzano-Román et al. (2006)
	Oe45	Not determined	Native protein, purified from midgut membranes	–	Pig	21–27% reduction in nymphs survival, 35–42% reduction in female feeding and fecundity	Manzano-Román et al. (2007)
	rOeSub	<i>O. erraticus</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	22% reduction in oviposition	Manzano-Román et al. (2012b)
	rOmSub	<i>O. moubata</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	24.3% reduction in oviposition	
	<i>O. moubata</i>	OE1	<i>O. erraticus</i> subolesin	Synthetic peptides	Transcription factor	Rabbit	49% reduction in fecundity
OE2		<i>O. erraticus</i> subolesin	82% reduction in fecundity				
OM1		<i>O. moubata</i> subolesin	50% reduction in fecundity				
OM2		<i>O. moubata</i> subolesin	17% reduction in fecundity				
Egg yolk protein		Vitelisin	Native	Embryonic development	Rabbit	50% reduction in oviposition	Chinzei and Minoura (1988) García-Varas (2004)
GME		–	Membrane proteins (insoluble fraction of midgut extract)	–	Mouse, rabbit, pig	40% reduction in female feeding and reproduction	
rOeSub		<i>O. erraticus</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	8.5% reduction in oviposition	Manzano-Román et al. (2012b)
rOmSub		<i>O. moubata</i> subolesin	Recombinant	Transcription factor	Rabbit	5.2% reduction in oviposition	
OE1		<i>O. erraticus</i> subolesin	Synthetic peptides	Transcription factor	Rabbit	35% reduction in fecundity	Manzano-Román et al. (2015)
OE2		<i>O. erraticus</i> subolesin				40% reduction in fecundity	
OM1		<i>O. moubata</i> subolesin				45% reduction in fecundity	
OM2	<i>O. moubata</i> subolesin	60% reduction in fecundity					
<i>O. talaje</i>	Gut	–	Tissue extract	–	CD1 mouse	32% reduction in tick survival	Need and Butler (1991)
	Internal organs, not gut	–	Tissue extract	–	CD1 mouse	27% reduction in tick survival	
<i>O. turicata</i>	Gut	–	Tissue extract	–	CD1 mouse	No protection	Need and Butler (1991)
	Internal organs, not gut	–	Tissue extract	–	CD1 mouse	No protection	
Salivary antigens							
<i>Argas polonicus</i>	SGE	–	Salivary gland extract	–	Pigeon	No protection	Dusbábeck et al. (1990)
<i>Argas persicus</i>	SGE	–	Salivary gland extract	–	Chicken	58–62% rejection of feeding ticks	Sayed et al. (2001)
<i>O. erraticus</i>	SGE	–	Salivary gland extract	–	Pig	Variable, <50% reduction in female feeding and fecundity	Astigarraga et al. (1995)
	70 kDa antigen	Not determined	Native, purified from SGE	Not determined	Pig	No protection	Manzano-Román (2002)
	50 kDa antigen	Not determined	Native, purified from SGE	Not determined	Pig	No protection	

Table 1 (Continued)

Species	Antigen name	Protein identity	Protein type	Protein function	Host	Protection	Reference
<i>O. moubata</i>	20 kDa antigen	Not determined	Native, purified from SGE	Not determined	Pig	Up to 50% reduction in female feeding and fecundity	Astigarraga et al. (1995)
	SGE	–	Salivary gland extract	–	Pig	60–70% reduction in female feeding and fecundity	
	Om44	–	Native	P-selectin antagonist	Pig	54% reduction in tick feeding, 50% reduction in female fecundity	García-Varas et al. (2010)
	OmC2	Cystatin	Recombinant	Peptidase inhibitor	C3H/HeN mouse	39% reduction in nymph-1 feeding, 15% increase in nymph-1 mortality	Salat et al. (2010)
	rOmENO	Enolase	Recombinant	Glycolytic enzyme	Rabbit	18% reduction in female fecundity, 20% increase in nymphal mortality	Díaz-Martín et al. (2013)
	rOmPLA2	Phospholipase A ₂	Recombinant	Anti-haemostatic	Rabbit	23% reduction in female fertility, 11–32% increase in tick mortality (E = 44.2%) ^a	Díaz Martín (2014)
	rOmAPY	Apyrase	Recombinant	Anti-platelet aggregation	Rabbit	26% reduction in female fertility, 16% increase in adult mortality (E = 27.2%) ^a	
<i>O. talaje</i>	rOmMOU	Mougrin	Recombinant	Disaggregin	Rabbit	32% reduction in female fecundity (E = 43.2%) ^a	
	SGE	–	Salivary gland extract	–	CD1 mouse	19% reduction in larvae survival	Need and Butler (1991)

^a Vaccine efficacy (E) was calculated as $E = 100 (1 - S \times F)$, where S and F respectively represent the reduction in female survival and fertility in ticks fed on vaccinated rabbits as compared to those fed on control rabbits (treated with the adjuvant only).

rabbits with egg vitellin and obtained a protective response that reduced female fecundity by 50%. Most likely, the protective mechanism would have been exerted by host antibodies specific to vitellin/vitellogenin passing from the tick midgut lumen to the haemolymph, where they would have bound to haemolymph-borne vitellogenin thus blocking vitellogenin uptake by oocytes in the ovary (Ben-Yakir, 1989; Chinzei and Minoura, 1988; Gudderra et al., 2002; Horigane et al., 2010; Kopacek et al., 2000).

Soon after, Need and Butler (1991) immunized CD1 mice with protein extracts from midgut and from the remaining internal organs obtained from both *O. turicata* and *O. talaje* ticks. The larvae of these two species were allowed to feed on vaccinated mice and while no effect on the larvae of *O. turicata* was observed, the larvae of *O. talaje* had an increased mortality rate of up to 29%. Since host antibodies (mainly IgG1) were detected in the haemolymph of the larvae of both species, the authors attributed the protective response against the long feeding *O. talaje* larvae to cellular immune effectors. Although this observation is correct, the role of antibodies in conferring protection should not be underestimated. Protection may have been associated to higher antibody quality (affinity vs. avidity) instead to higher antibody titre (Vidarsson et al., 2014) or higher antibody exposition as a consequence of prolonged feeding behaviour. Moreover, protection could have been greatly determined by the particular epitopes (protective or not) that were actually presented and recognized by the host immune system in each antigen preparation. A real example of this is commented below (Manzano-Román et al., 2015).

In 1995, our group began the studies on soft-tick concealed antigens by immunizing pigs with soluble extracts of haemolymph, synganglion, coxal glands and midgut from *O. erraticus* (Astigarraga et al., 1995). In these experiments, we did not observe any adverse effect on *O. erraticus* specimens fed on the vaccinated animals. The

lack of protection was attributed to the unwanted removal of the membrane proteins from the antigenic extracts during their preparation procedure since, according to the criteria described before, membrane proteins (and particularly those expressed on the luminal surface of enterocytes) would have been the most adequate vaccine candidates.

Subsequently, Manzano-Román (2002) confirmed the above-mentioned hypothesis as he observed the following. Extracts of membrane proteins from the midgut epithelial cells of *O. erraticus* induced protective responses in pigs, rabbits and mice that reduced females feeding and fecundity by up to 50% and, additionally, caused up to 80% mortality in nymphs fed on vaccinated animals during the first 72 h post-feeding. The antigen responsible for protection was a 45 kDa protein (Oe45) expressed on the luminal surface of midgut epithelial cells between 24 and 72 h post-feeding. The protective mechanism involved the fixation and activation of the host complement system onto the membrane of enterocytes by anti-Oe45 antibodies. This caused enterocyte lysis and midgut damage in a similar way to what was observed for the commercial anti-tick vaccines based on the Bm86 antigen (Manzano-Román et al., 2006, 2007).

The high level of protection achieved with the enterocyte membrane antigens of *O. erraticus* encouraged us to test the protective potential of a similar antigenic extract from *O. moubata* (García-Varas, 2004). With this species, the protective effect was lower and essentially consisted of a 40% decrease in feeding and reproduction without affecting tick survival. At the time, the absence of tick lethality was attributed to the fact that *O. moubata* secretes coxal fluid while it is still feeding whereas *O. erraticus* does so after detachment. Accordingly, in *O. moubata* the ingested blood could reach the midgut ceca in a sufficiently concentrated form to prevent antibodies and complement factors from diffusing to the luminal surface

of the enterocytes and reaching their target antigen (García-Varas, 2004).

Finally, in two recent studies our team investigated the protective value of the *O. erraticus* and *O. moubata* subolesin orthologues. Subolesin was first discovered as a protective antigen in *Ixodes scapularis* (Almazán et al., 2003). Later, it was demonstrated that subolesin is an orthologue of insect and vertebrate akirins, which are evolutionarily conserved proteins that function as transcription factors in the regulation of gene expression thus affecting numerous processes such as feeding, fertility and tissue development (Galindo et al., 2009; Goto et al., 2008). Moreover, subolesin was found to be functionally involved in innate tick immunity to pathogens and in the infection and multiplication of some pathogens such as *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale*, *Babesia bigemina* and *Borrelia burgdorferi* (de la Fuente et al., 2013). Subolesin gene knockdown by RNAi and vaccination with recombinant subolesin/akirin has a profound effect on tick infestations reducing tick numbers, weight and oviposition, as well as on tick infection with different tick-borne pathogens. Additionally, subolesin/akirin orthologues share common structural and protective epitopes in different arthropod vector species including hard ticks, mosquitoes, sand flies, poultry red mites and sea lice. This highlights the potential of subolesin/akirin-based vaccines for the control of vectors and vector-borne pathogens (de la Fuente et al., 2011, 2013; Moreno-Cid et al., 2013).

Regarding the protective value of subolesin against soft ticks, we observed that knocking down the subolesin gene orthologues in *O. erraticus* and *O. moubata* by RNAi inhibited tick oviposition by more than 90% without affecting tick feeding and survival. However, vaccination with the corresponding recombinant proteins induced robust but low protective humoral responses (5–24.5% reduction in oviposition) (Manzano-Román et al., 2012b).

Trying to explain the reason for this low degree of protection, it was later observed that vaccination with whole subolesin recombinants induced non-protective antibodies mainly directed to immunodominant linear B-cell epitopes located on highly structured regions of the subolesin protein. Structured regions are likely unrelated to the subolesin biological activity, while the unstructured/disordered regions of the protein, which are assumed to contain the functional site, were not recognized by the vaccine-induced antibodies. Subsequently, four synthetic peptides from the unrecognized/disordered regions of the *Ornithodoros* subolesin sequences were designed, synthesized and coupled to keyhole limpet haemocyanin (KLH). Vaccination with KLH-peptide conjugates induced the synthesis of specific antibodies that recognized linear B-cell epitopes located on the unstructured loops of the subolesin proteins and provided up to 70.1% and 83.1% vaccine efficacies against *O. erraticus* and *O. moubata*, respectively (Manzano-Román et al., 2015). These results demonstrated that the protective effect of subolesin-based vaccines was highly dependent on the particular epitope being recognized by antibodies and strongly suggest that the biological activity of subolesin is exerted through its unstructured regions, in accordance with recent findings by de la Fuente et al. (2013), Merino et al. (2013) and Moreno-Cid et al. (2013).

Overall, these results contribute to our understanding of the mechanism of protection of subolesin-based vaccines. They point to additional protective peptides for inclusion in the array of candidate antigens and expand the range of target organisms for subolesin/akirin-based vaccines against soft ticks.

Salivary antigens

In general, the few vaccine trials performed to date with salivary antigens have reported highly variable protection efficacies. Need and Butler (1991) reported 16% mortality in *O. talaje* larvae

fed on CD1 mice vaccinated with a salivary gland extract (SGE) from that species, similar to the mortality rate observed in mice immunized by natural contact. More recently, Salat et al. (2010) evaluated the protective potential of recombinant OmC2 cystatin from *O. moubata* in C3H/HeN mice and found 15% increase in mortality and 39% reduction in the feeding of *O. moubata* nymphs-1 fed on vaccinated mice.

Regarding the studies on soft tick salivary antigens carried out by our team, these were begun by vaccinating pigs with SGE obtained from *O. erraticus* and *O. moubata* (Astigarraga et al., 1995).

Vaccination with *O. erraticus* SGE induced highly variable protective responses, the best of them attaining a 50% reduction in the feeding and fecundity of females. These results clearly showed that at least in *O. erraticus* it was possible to induce protective responses using salivary antigens. The protection was associated to several silent antigens of the SGE (namely, three proteins of 70, 50 and 20 kDa) that were specifically recognized by the humoral immune response of the SGE-vaccinated pigs but not recognized by the humoral response of unprotected pigs sensitized by natural parasite contact (Astigarraga et al., 1995). Subsequently, to identify antigens able to induce uniform humoral protective responses, Manzano-Román (2002) purified these three proteins from the SGE and tested them individually in new vaccine trials. All pigs vaccinated with either the 70 kDa or 50 kDa antigens developed antibody responses that specifically recognized the inducing antigen. However, these responses did not protect precluding the usefulness of these antigens as vaccine candidates. By contrast, only a part of all the pigs vaccinated with the 20 kDa antigen were able to develop a specific antibody response to it. This response was protective and reduced female feeding and subsequently female fertility by up to 50%. However, most pigs vaccinated with the 20 kDa antigen were unable to develop a detectable antibody response to this antigen (regardless of the dose, the adjuvant used or the mode of administration) and none of these pigs were protected. From these observations it was concluded that protection can be achieved after the antibody-mediated neutralization of a particular silent salivary antigen (such that of 20 kDa). This antigen seems to be strongly protected from being recognized by the host immune system, as suggested by the difficulties encountered in inducing humoral responses to it in all the vaccinated animals thus limiting its efficacy as vaccine candidate (Manzano-Román, 2002). The disadvantages and limitations of these three salivary antigens avoided further sequence and functional characterization. Thus, their sequences and functions as well as how the 20 kDa antigen evades its recognition by the immune system remain unknown.

Regarding *O. moubata*, pig vaccination with SGE induced very homogeneous protective responses causing 60% to 70% reductions in adult tick feeding and female oviposition. All vaccinated animals recognized a protein of 44 kDa (hence the name Om44), which was never recognized by the host immune system during natural parasite contact (Astigarraga et al., 1995).

Subsequent studies revealed that purified Om44 induced in pigs and rabbits a protective response that inhibited tick feeding by up to 54% and the protective effect increased with successive *O. moubata* infestations (García-Varas et al., 2010). Thus, Om44 must be a silent salivary antigen according to the concept introduced by Kotsyfakis et al. (2008). Functional characterization of Om44 showed that it is an antagonist ligand of host P-selectin. Accordingly, Om44 probably inhibits the host haemostatic and inflammatory response triggered at the tick bite lesion by the interaction between P-selectin on activated endothelial cells and platelets and its receptor on leucocytes, the PSLG-1 molecule (Cleator et al., 2006; García-Varas et al., 2010). Since this response could prevent tick feeding, blocking the P-selectin/PSLG-1 interaction at the tick bite site seems to be critical for *O. moubata* to complete its feeding. These results represented the first evidence of a new anti-haemostatic mechanism

of hematophagous vectors and led Om44 to be assigned the place of an important candidate for vaccine development.

The identification of Om44 was repeatedly attempted by mass spectrometry without success. Mass spectrometric data clearly showed that Om44 was not an orthologue of already established P-selectin ligands including PSGL-1 and pentraxin 3. However, the results of some of the analyses performed suggested that Om44 could be an isoform of enolase (García-Varas et al., 2010; Pérez-Sánchez et al., 2010). Since significant amounts of secreted enolase had been found in the saliva of *O. moubata* ticks (Díaz-Martín et al., 2013a), this protein was cloned and functionally characterized. The results of this study showed that secreted salivary enolase acts as a profibrinolytic receptor of host plasminogen confirming that it was not the identity of Om44. Additionally, vaccination of rabbits with recombinant enolase induced partial protective responses (18% reduction in oviposition and up to 20% nymphal mortality) differed from those induced by Om44 (Díaz-Martín et al., 2013b).

In order to identify Om44, more recently self-assembled protein microarrays from an *O. moubata* salivary gland expression library were screened using P-selectin and anti-Om44 polyclonal serum as probes. The results of these experiments indicated that Om44 was a salivary secreted phospholipase A₂ (GenBank KC908103.1) that binds to P-selectin through protein-protein interactions without the involvement of glycan moieties (Díaz Martín, 2014; Manzano-Román et al., 2012c).

Moreover, random sequencing of the above expression library allowed us to identify two additional anti-haemostatic salivary proteins of *O. moubata*, in particular an apyrase (GenBank KC908110.1) and a disaggregin (named as mougrin) that is orthologous to the savignygrin of *O. savignyi* (GenBank KC908105.1). Vaccination of rabbits with the recombinant forms of these three salivary proteins (elicited individual protective efficacies between 27% and 44% (Table 1). These results indicate that *O. moubata* salivary anti-haemostatics are suitable antigen candidates for the development of anti-tick vaccines that deserve further studies (Díaz Martín, 2014).

Overall, these results confirm that soft tick salivary antigens are able to induce protective immune responses when administered individually. Such protection essentially consists of the partial inhibition of blood feeding and subsequent reduction in female fertility, most likely as a consequence of the antibody-mediated loss of function of the target antigen at the tick-host interface.

Although exploring additional adjuvants and immunization protocols would probably increase the protective efficacies of these antigens, our opinion is that a main factor limiting the protection achieved with these vaccines (based on recombinant salivary antigens administered individually) is the complexity, multiplicity and functional redundancy of tick saliva composition, which would compensate the vaccine-mediated loss of function of the target antigen with non-targeted salivary proteins exerting redundant functions (Chmelař et al., 2012; Kazimířová and Štibrániová, 2013; Wikel, 2013; Willadsen, 2008). Hence, the use of vaccines formulated with several target antigens would likely increase the protective efficacy of such vaccines.

In addition, the identification of the protective epitopes on those antigens would allow the construction of chimeric recombinant antigens in order to simultaneously target redundant anti-defensive mechanisms in ticks. Accordingly, the results described here could serve as a starting point to search for protective epitopes in immunogenic proteins from arasids (such as phospholipase A₂, apyrase and mougrin) that have functional orthologues in ixodids to identify similar or conserved protective epitopes. The identification and inclusion in a chimeric recombinant antigen of such epitopes would offer the possibility of obtaining broader-spectrum vaccines that could be useful for the control of a greater number of vectors and by extension the pathogens they transmit (de la

Fuente, 2012; Merino et al., 2013; Parizi et al., 2012; Prudencio et al., 2010).

According to Sikic and Carugo (2010), the increasing potential of new computational tools for selecting proteins with specific functions can aid in large-scale analyses for the identification of potential new antigen targets for vaccines. This could also be applied to the identification and designing of synthetic epitopes conserved in redundant protein families.

Future prospects and new strategies for the identification of novel protective antigens

In his review on anti-tick vaccines, Willadsen (2008) analyzed the three main types of experimental approaches traditionally used for identifying useful vaccine antigens in ticks: i.e., the immunological one, based on studying antigens that elicit an immune response; the functional one, based on identifying tick factors important for the parasite's function and survival and then evaluating them as potential vaccine antigens; and biochemical fractionation, based on evaluating progressively simpler protein mixtures by host vaccination and parasite challenge trials.

Currently, the increasing availability of tick genomic, transcriptomic and proteomic sequences in public data bases (namely: VectorBase, The Gene Index Project, CattleTickBase) together with the development and application of new technologies of large-scale analysis (NGS, RNAseq, microarrays, etc.) is driving the rapid transition from the above-mentioned traditional approaches for protective antigen identification to new strategies based on reverse vaccinology, which constitute a very important part of the emerging field of vaccinomics (Aljamali et al., 2009a, 2009b; de la Fuente and Merino, 2013; Flower et al., 2010; Guerrero et al., 2012; Manzano-Román et al., 2013; Maritz-Olivier et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Ribeiro and Arcà, 2009; Ribeiro et al., 2011, 2012).

These holistic approaches analyze the interactions between hosts, ticks and pathogens, obtaining genomic, transcriptomic, proteomic, immunological and metabolic information (systems biology) that is later integrated and analyzed *in silico* to perform a theoretical, hypothesis-driven selection of candidate vaccine antigens (Nakaya et al., 2012; Six et al., 2012). The resulting candidate antigen list can then be progressively reduced by carrying out relatively simple and cost-effective experimental assays in order to select those with the highest protective potential. One of these assays is the RNAi-mediated gene knockdown (de la Fuente et al., 2010; Manzano-Román et al., 2012b, 2012c). In spite of its limitations, which include the potential incongruity between RNAi loss of function phenotypes and vaccine efficacy of the involved proteins *in vivo* (Nijhof et al., 2007), RNAi has demonstrated a great potential in the context of screening genomic and transcriptomic data from arthropod ectoparasites becoming an attractive post-genomic tool to inform the selection of vaccine candidates (Marr et al., 2014). Selected candidates could then be obtained as recombinant proteins and validated as protective antigens in animal vaccination trials, and their function and protective mechanism could be characterized (de la Fuente and Merino, 2013) (Fig. 1).

The application of these new strategies to soft ticks has just begun. The scant transcriptomic and proteomic data currently available are limited to the salivary glands and/or saliva of half a dozen species (Díaz-Martín et al., 2013a; Francischetti et al., 2009; Ribeiro et al., 2012) while no "omic" data from any other tissue or organ from soft ticks have been obtained.

Some available comparative analyses of the soft and hard tick sialomes indicate that the major families of salivary proteins are conserved between tick families encouraging the search for conserved protective antigens (Mans et al., 2008). Obtaining and analysing sialomes from more soft tick vectors will provide

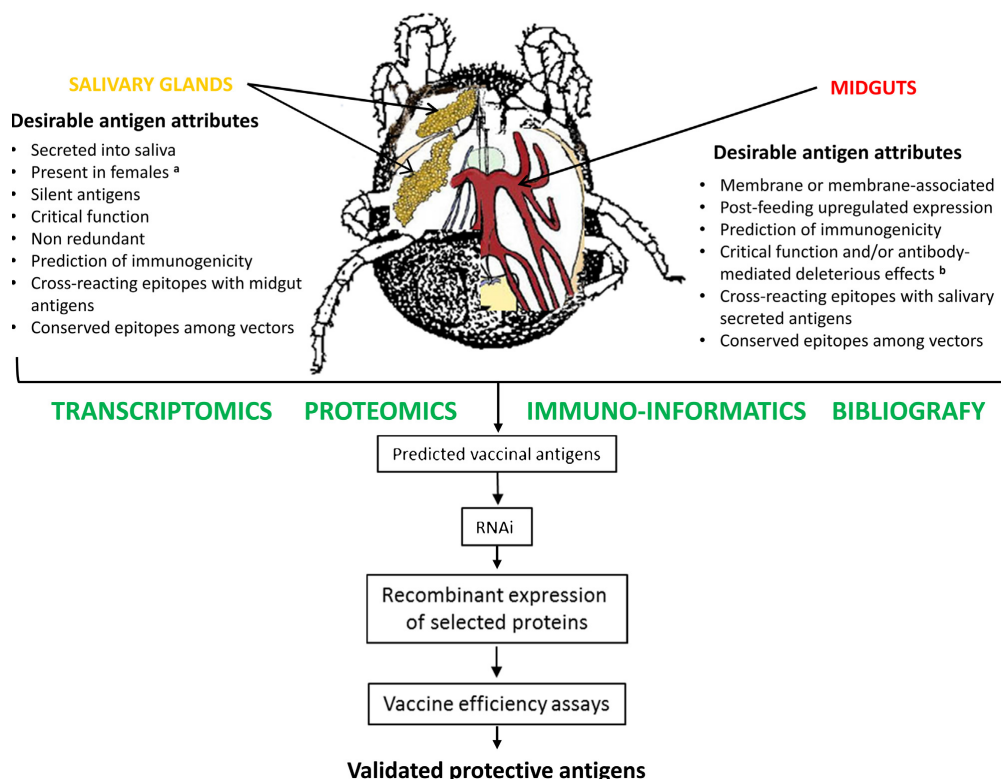


Fig. 1. Reverse vaccinology approaches for the identification and validation of soft tick protective antigens. When searching for suitable vaccine candidates a number of desirable attributes might be taken into consideration. Currently, tick midgut and salivary glands are being prioritized as the most appropriate sources of protective antigens. The transcriptomic, proteomic and immunological data from the targeted organ or tissue are integrated and analyzed *in silico* performing a theoretical selection of vaccine candidates. The resulting candidate antigen list can be progressively reduced by applying experimental tools (i.e., RNAi) that may inform on antigens with high protective potential. Selected candidates are obtained as recombinant proteins and validated as protective antigens in animal vaccination trials. ^a Salivary antigens from females are prioritized in order to target feeding (and fecundity) in this developmental stage. ^b For midgut antigens, vaccine-derived deleterious effects can be independent of the antigen function if the antigen acts as an anchor for host immune effectors such as antibodies and complement (i.e., Bm86).

valuable data to identify new vaccine candidates including potential dual-action antigens if proved that they are secreted into saliva and so that exposed to host in natural contact. Hence our group applied proteomics to study the saliva of *O. moubata* unveiling notable differences in the saliva composition between females and males as well as a high ratio of intracellular housekeeping proteins that were secreted to saliva by non-classical ways, which significantly increased the expected range of salivary proteins exposed to the host immune system during natural infestations (Díaz-Martín et al., 2013a). Moreover, we developed Nucleic Acid Programmable Protein Arrays (NAPPA) from an *O. moubata* salivary gland cDNA expression library to study protein interactions and functions in a high-throughput format and cell-free system. As mentioned previously, the screening of these microarrays allowed identifying some new salivary protective antigens (Manzano-Román et al., 2012b).

As highlighted in "Desirable attributes in candidate antigens for the development of anti-tick vaccines", a number of current research programmes are prioritizing the identification of protective antigens that are expressed in the midgut membranes of hard ticks. This should be also a priority for soft ticks but the absence of argasid genomes and argasid midgut transcriptomes and proteomes is precluding the application of reverse vaccinology strategies to the identification of intestinal protective antigens.

Therefore, obtaining and analysing midgut transcriptomes and proteomes from soft tick vectors is urgently needed. This information will facilitate basic knowledge about the biology of these parasites and their relationship with hosts and tick-borne pathogens. This information will also permit comparisons to ixodid midgut transcriptomes and proteomes and probably the identification of conserved antigens in both tick families allowing the selection of target antigens. The combination of key midgut and salivary antigens will facilitate development of wide-range highly effective vaccines for the control of ticks and the diseases they transmit.

Acknowledgements

We thank the financial support provided by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grants no. AGL2010-18164 and AGL2013-42745-P). We also thank N.S. Skinner for his assistance with English editing.

References

- Aljamali, M.N., Hern, L., Kupfer, D., Downard, S., So, S., Roe, B.A., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2009a. Transcriptome analysis of the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum*. *Insect Mol. Biol.* 18, 129–154.

- Aljamali, M.N., Ramakrishnan, V.G., Weng, H., Tucker, J.S., Sauer, J.R., Essenberg, R.C., 2009b. Microarray analysis of gene expression changes in feeding female and male lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 71, 236–253.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., García-García, J.C., Blouin, E.F., de la Fuente, J., 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492–1501.
- Anderson, J.M., Sonenshine, D.E., Valenzuela, J.G., 2008. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* 9, 552.
- Astigarraga, A., Oleaga-Pérez, A., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., 1995. A study of the vaccinal value of various extracts of concealed antigens and salivary gland extracts against *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata*. *Vet. Parasitol.* 60, 133–147.
- Ben-Yakir, D., 1989. Quantitative studies of host immunoglobulin G in the haemolymph of ticks (Acari). *J. Med. Entomol.* 26, 243–246.
- Boinas, F., Ribeiro, R., Madeira, S., Palma, M., Lopes de Carvalho, I., Nuncio, S., Wilson, A.J., 2013. The medical and veterinary role of *Ornithodoros erraticus* complex ticks (Acari: Ixodidae) on the Iberian Peninsula. *J. Vec. Ecol.* 39, 238–248.
- Brake, D.K., Pérez de León, A.A., 2012. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasit. Vectors* 5, 38.
- Cleator, J.H., Zhu, W.Q., Vaughan, D.E., Hamm, H.E., 2006. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* 107, 2736–2744.
- Costard, S., Mur, L., Lubroth, J., Sánchez-Vizcaino, J.M., Pfeiffer, D.U., 2013. Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res.* 173, 191–197.
- Cutler, S.J., 2006. Possibilities for relapsing fever re-emergence. *Emer. Infect. Dis.* 12, 369–374.
- Cutler, S.J., 2010. Relapsing fever – a forgotten disease revealed. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1115–1122.
- Chinzei, Y., Minoura, H., 1988. Reduced oviposition in *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae) fed on tick-sensitized and vitellin-immunized rabbits. *J. Med. Entomol.* 25, 26–31.
- Chmela, J., Calvo, E., Pedra, J.H., Francischetti, I.M., Kotsyfakis, M., 2012. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J. Proteomics* 75, 3842–3854.
- de la Fuente, J., 2012. Vaccines for vector control: exciting possibilities for the future. *Vet. J.* 194, 139–140.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 23–28.
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., 2008. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Bioscience* 13, 6938–6946.
- de la Fuente, J., Manzano-Román, R., Naranjo, V., Kocan, K.M., Zivkovic, Z., Blouin, E.F., Canales, M., Almazán, C., Galindo, R.C., Step, D.L., Villar, M., 2010. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* 28, 1786–1795.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazán, C., Blouin, E.F., 2011. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Vet. Parasitol.* 181, 17–22.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Almazán, C., Kocan, K.M., Merino, O., Pérez de la Lastra, J.M., Estrada-Peña, A., Blouin, E.F., 2013. Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vectorborne pathogens. *Trans. Emer. Dis.* 60 (Suppl. 2), 172–178.
- de la Fuente, J., Merino, O., 2013. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine* 31, 5923–5929.
- Diatta, G., Souidi, Y., Granjon, L., Arnathau, C., Durand, P., Chauvancy, G., Mané, H., Sari, M., Belghyti, D., Renaud, F., Trape, J.F., 2012. Epidemiology of tick-borne Borreliosis in Morocco. *Plos Negl. Trop. Dis.* 6, e1810.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2013a. An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. *J. Proteomics* 80, 216–235.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2013b. Cloning and characterization of a plasminogen-binding enolase from the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Vet. Parasitol.* 191, 301–314.
- Díaz Martín, V., (Doctoral thesis) 2014. Análisis de la saliva de *Ornithodoros moubata* y producción de antígenos recombinantes para el desarrollo de test serológicos y vacunas antiarrapata. Universidad de Salamanca, Spain <http://hdl.handle.net/10261/101385>
- Dusbábek, F., Konohvá, P., Grubhoffer, L., Lukes, S., 1990. Artificial immunization of pigeons against *Argas polonicus* (Ixodoidea, Argasidae). *Med. Vet. Entomol.* 4, 315–320.
- EFSA, 2010a. Scientific opinion on geographic distribution of tick-borne infections and their vectors in Europe and the other regions of the Mediterranean Basin. *EFSA Journal* 8 (9), 1723, ISSN 1831-4732.
- EFSA, 2010b. Scientific opinion on the role of tick vectors in the epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever and African Swine Fever in Eurasia. *EFSA Journal* 8 (8), 1703, ISSN 1831-4732.
- EFSA, 2010c. Scientific opinion on African Swine Fever. *EFSA Journal* 8 (3), 1556, ISSN 1831-4732.
- Fernandes, E.K., Bittencourt, V.R., 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 46, 71–93.
- Flower, D.R., Macdonald, I.K., Ramakrishnan, K., Davies, M.N., Doytchinova, I.A., 2010. Computer aided selection of candidate vaccine antigens. *Immunome Res.* 6 (Suppl. 2), S1.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* 14, 2051–2088.
- Galindo, R.C., Doncel-Pérez, E., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Gortazar, C., Mangold, A.J., Martín-Hernando, M.P., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2009. Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 612–617.
- García-Varas, S., (Doctoral thesis) 2004. Vacuna Anti-*Ornithodoros moubata*. Universidad de Salamanca, Spain <http://hdl.handle.net/10261/11031>
- García-Varas, S., Manzano-Román, R., Fernández-Soto, P., Encinas-Grandes, A., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., 2010. Purification and characterisation of a P-selectin-binding molecule from the salivary glands of *Ornithodoros moubata* that induces protective anti-tick immune responses in pigs. *Int. J. Parasitol.* 40, 313–326.
- George, J.E., Pound, J.M., Davey, R.B., 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129 (Suppl.), S353–S366.
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P., 2007. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J. Vector Borne Dis.* 44, 79–89.
- Goto, A., Matsushita, K., Geselchen, V., El Chamy, L., Kutteneuler, D., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., Akira, S., Boutros, M., Reichhart, J.M., 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in *Drosophila* and mice. *Nature Immunol.* 9, 97–104.
- Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L., Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129 (Suppl.), S427–S442.
- Gudder, N.P., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M., 2002. Haemolymph proteins in ticks. *J. Insect Physiol.* 48, 269–278.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Pérez de León, A.A., 2012. Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *Int. J. Parasitol.* 42, 421–427.
- Habib, S.M., Sewify, G.H., 2002. Biological control of the fowl *Argas (Persicargas) persicus* (Laterreille) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metharhizium anisopliae*. *Egypt. J. Biol. Pest Control* 12, 11–13.
- Heekin, A.M., Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Saldivar, L., Scoles, G.A., Dowd, S.E., Gondro, C., Nene, V., Dijkeng, A., Brayton, K.A., 2013. Gut transcriptome of replete adult female cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding upon a Babesia bovis-infected bovine host. *Parasitol. Res.* 112, 3075–3090.
- Herrero, N., Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Zabalgogazcoa, I., 2011. Tick pathogenicity, thermal tolerance and virus infection in *Tolypocladium cylindrosporum*. *Ann. Appl. Biol.* 159, 192–201.
- Hoogstraal, H., 1956. Faunal exploration as a basic approach for studying infections common to man and animals. *East African Med. J.* 33, 417–424.
- Horigane, M., Shinoda, T., Honda, H., Taylor, D., 2010. Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Mol. Biol.* 19, 501–515.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–994.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 (Suppl.), S3–S14.
- Kazimirová, M., Štibrániová, I., 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 43.
- Kongsuwan, K., Josh, P., Zhu, Y., Pearson, R., Gough, J., Colgrave, M.L., 2010. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *J. Insect Physiol.* 56, 212–226.
- Kopacek, P., Weise, C., Saravanan, T., Vitova, K., Grubhoffer, L., 2000. Characterization of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Eur. J. Biochem.* 267, 465–475.
- Kotsyfakis, M., Anderson, J.M., Andersen, J.F., Calvo, E., Francischetti, I.M., Mather, T.N., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., 2008. Cutting edge: immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J. Immunol.* 181, 5209–5212.
- Latif, A.A., Putterill, J.F., de Klerk, D.G., Pienaar, R., Mans, B.J., 2012. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. *PLoS ONE* 7, e41651.
- Mans, B.J., Neitz, A.W.H., 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1–17.
- Mans, B.J., Andersen, J.F., Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Schwan, T.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Hammer, C.H., Ribeiro, J.M., 2008. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 42–58.
- Manzano-Román, R., (Doctoral thesis) 2002. Vacuna Anti-*Ornithodoros erraticus*. Universidad de Salamanca, Spain <http://hdl.handle.net/10261/10366>
- Manzano-Román, R., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2006. Antigens from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* induce lethal anti-tick immune responses in pigs and mice. *Vet. Parasitol.* 135, 65–79.
- Manzano-Román, R., García-Varas, S., Encinas-Grandes, A., Pérez-Sánchez, R., 2007. Purification and characterization of a 45-kDa concealed antigen from the midgut membranes of *Ornithodoros erraticus* that induces lethal anti-tick immune responses in pigs. *Vet. Parasitol.* 145, 314–325.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., de la Fuente, J., Ricardo Pérez-Sánchez, R., 2012a. Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control. In: Manjun, S. (Ed.), *Parasitology*. Intech, Rijeka, Croatia, pp. 125–162.

- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Pérez-Sánchez, R., 2012b. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Vet. Parasitol.* 185, 248–259.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., González-González, M., Matarraz, S., Álvarez-Prado, A.F., LaBaer, J., Orfao, A., Pérez-Sánchez, R., Fuentes, M., 2012c. Self-assembled protein arrays from an *Ornithodoros moubata* salivary gland expression library. *J. Proteome Res.* 11, 5972–5982.
- Manzano-Román, R., Dasilva, N., Díez, P., Díaz-Martín, V., Pérez-Sánchez, R., Orfao, A., Fuentes, M., 2013. Protein arrays as tool for studies at the host–pathogen interface. *J. Proteomics* 94, 387–400.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., 2015. Identification of protective linear B-cell epitopes on the subolesin/akirin orthologues of *Ornithodoros* spp. soft ticks. *Vaccine* 33, 1046–1055.
- Maritz-Olivier, C., van Zyl, W., Stutzer, C., 2012. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 179–187.
- Marr, E.J., Sargison, N.D., Nisbet, A.J., Burgess, T.J., 2014. RNA interference for the identification of ectoparasite vaccine candidates. *Parasite Immunol.* 36, 616–626.
- Ment, D., Gindin, G., Rot, A., Eshel, D., Teper-Bamnolker, P., Ben-Ze'ev, I., Glazer, I., Samish, M., 2013. Role of cuticular lipids and water-soluble compounds in tick susceptibility to *Metarhizium* infection. *Biocontr. Sci. Technol.* 23, 956–967.
- Merino, O., Alberdi, P., Pérez de la Lastra, J.M., de la Fuente, J., 2013. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 30.
- Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Villar, M., Jiménez, M., Pinal, R., Estrada-Peña, A., Molina, R., Lucientes, J., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2013. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine* 31, 1187–1196.
- Nakaya, H.I., Li, S., Pulendran, B., 2012. Systems vaccinology: learning to compute the behavior of vaccine induced immunity. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 193–205.
- Need, J.T., Butler, J.F., 1991. Possible applications of the immune response of laboratory mice to the feeding of argasid ticks. *J. Med. Entomol.* 28, 250–253.
- Nijhof, A.M., Taoufik, A., de la Fuente, J., Kocan, K.M., de Vries, E., Jongejans, F., 2007. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 37, 653–662.
- Nuttall, P., Trimmel, A.R., Kazimirova, M., Labuda, M., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 28, 155–163.
- Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., 1990. Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever. *Vet. Rec.* 126, 32–37.
- Oliveira, C.J., Anatriello, E., de Miranda-Santos, I.K., Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Ferreira, B.R., Ribeiro, J.M., 2013. Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 469–477.
- Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz Jr., L., 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Vet. J.* 194, 158–165.
- Penrith, M.L., Vosloo, W., Jori, F., Bastos, A.D., 2013. African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Research* 173, 228–246.
- Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., Siles-Lucas, M., Díaz-Martín, V., De La Torre, E., Hernández-González, A., Manzano-Román, R., 2010. Aplicación de eucalizadores de proteínas para la identificación de antígenos minoritarios de *Ornithodoros moubata*. *Proteómica* 5, 143–145.
- Polar, P., Moore, D., Kairo, M.T.K., Ramsbuhag, A., 2008. Topically applied acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp. Appl. Acarol.* 46, 119–148.
- Popara, M., Villar, M., Mateos-Hernández, L., de Mera, I.G.F., Marina, A., del Valle, M., Almazán, C., Domingos, A., de la Fuente, J., 2013. Lesser protein degradation machinery correlates with higher Bm86 tick vaccine efficacy in *Rhipicephalus annulatus* when compared to *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 31, 4728–4735.
- Pourseyed, S.H., Tavassoli, M., Bernousi, I., Mardani, K., 2010. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): an effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Vet. Parasitol.* 172, 305–310.
- Prudencio, C.R., Pérez de la Lastra, J.M., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J., 2010. Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine* 28, 5398–5406.
- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A., 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 152, 294–313.
- Reboudet, S., Parola, P., 2006. Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 11–15.
- Ren, Q., Liu, Z., Guan, G., Sun, M., Ma, M., Niu, Q., Li, Y., Liu, A., Liu, J., Yang, J., Yin, H., Luo, X., 2014. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Contr.* 63, 98–101.
- Ribeiro, J.M.C., Arcà, B., 2009. From Sialomes to the Sialoverse: an insight into salivary portion of blood-feeding insects. *Adv. Insect Physiol.* 37, 59–118.
- Ribeiro, J.M.C., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M., 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 12, 136.
- Ribeiro, J.M.C., Labruna, M.B., Mans, B.J., Maruyama, S.R., Francischetti, I.M., Barizon, G.C., de Miranda Santos, I.K., 2012. The sialotranscriptome of *Anticicola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 332–342.
- Salat, J., Paesen, G.C., Rezacova, P., Kotsyfakis, M., Kovarova, Z., Sanda, M., Majtan, J., Grunclova, L., Horka, H., Andersen, J.F., Brynda, J., Horn, M., Nunn, M.A., Kopacek, P., Kopecky, J., Mares, M., 2010. Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Biochem. J.* 429, 103–112.
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2008. Anti-tick biological control agents: assessment and future perspectives. In: Bowman, A.S., Nuttall, P. (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 447–469.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Martínez-López, B., 2012. African swine fever: an epidemiological update. *Transb. Emerg. Dis.* 59 (Suppl. 1), 1–9.
- Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Gómez-Villamandos, J.C., Carrasco, L., 2015. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Path.* 152, 9e21.
- Sayed, M.A., Habeeb, S., El Kammah, K.M., 2001. Chicken immunological reaction to salivary gland proteins of *Argas persicus* (Oken) (Acari: Argasidae). *Int. J. Acarol.* 27, 145–149.
- Sayed, M.A., El Kammah, K.M., El-Fiky, Z.A., 2004. A preliminary study on the DNA-vaccine for chicken protection against tick *Argas persicus* (Oken, 1818). *Arab J. Biotech.* 7, 273–282.
- Sewify, G.H., Habib, S.M., 2001. Biological control of the tick fowl *Argas persicus* by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Pest Sci.* 74, 121–123.
- Sikic, K., Carugo, O., 2010. Protein sequence redundancy reduction: comparison of various methods. *Bioinformatics* 5, 234–239.
- Six, A., Bellier, B., Thomas-Vaslin, V., Klatzmann, D., 2012. Systems biology in vaccine design. *Microbial Biotech.* 5, 295–304.
- Sonenshine, D.E., Lange, R.S., Nicholson, W.L., 2002. *Ticks (Ixodidae)*. In: Müllen, G., Durden, L. (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, London, pp. 518–558.
- Trimmell, A.R., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine* 20, 3560–3568.
- Trimmell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23, 4329–4341.
- Vargas, M., Montero, C., Sánchez, D., Pérez, D., Valdes, M., Alfonso, A., Joglar, M., Machado, H., Rodríguez, E., Méndez, L., Leonart, R., Suarez, M., Fernández, E., Estrada, M.P., Rodríguez-Mallón, A., Farnos, O., 2010. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavaclus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Vet. Res.* 6, 43.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispen, T., 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5, 520.
- Vial, L., 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodidae: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite* 16, 191–202.
- Wikel, S., 2013. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front. Microbiol.* 4, 337.
- Wilson, A.J., R. Ribeiro, R., Boinas, F., 2013. Use of a Bayesian network model to identify factors associated with the presence of the tick *Ornithodoros erraticus* on pig farms in southern Portugal. *Prev. Vet. Med.* 110, 45–53.
- Willadsen, P., 2008. Anti-tick vaccines. In: Bowman, A.S., Nuttall, P. (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 424–446.
- Zabalgoizegozcoa, I., Oleaga, A., Pérez-Sánchez, R., 2008. Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Vet. Parasitol.* 158, 336–343.